

**Identifizierung pathogenitätsrelevanter
Gene in *Candida albicans* und
*Candida dubliniensis***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Bettina Böttcher
geboren am 09. September 1986 in Gera

Jena, Juni 17

Diese Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut Jena, von März 2011 bis Dezember 2012 in der Nachwuchsgruppe Molekularbiologische Grundlagen pathogener Pilze unter der Leitung von Dr. rer. nat. habil. Peter Staib und seit Januar 2013 in der Abteilung Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen – Lehrstuhl für Mikrobiologie und Molekulare Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Hube angefertigt. Finanziert wurde diese Doktorarbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Referenznummer: STA 1147/1-1) und das Hans-Knöll-Institut.



1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Hube
Abt. Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen, Hans-Knöll-Institut, Jena
2. Gutachter: PD Dr. Kerstin Voigt
Jena Microbial Resource Collection, Hans-Knöll-Institut, Jena
3. Gutachter: Prof. i. R. Dr. Joachim Ernst
Molekulare Mykologie c/o Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Datum der öffentlichen Verteidigung: 13. Februar 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Abstract.....	2
3	Einleitung.....	4
3.1	Pilze als Krankheitserreger.....	4
3.2	<i>Candida albicans</i> als Pathogen	5
3.2.1	Verlauf einer <i>C. albicans</i> -Infektion und deren Pathogenitätsmechanismen	5
3.2.1.1	Polymorphismus.....	6
3.2.1.2	„Nutritional Immunity“	8
3.2.2	Regulation von Pathogenitätsfaktoren.....	9
3.2.2.1	Transkriptionelle Regulation von Virulenzdeterminanten	9
3.2.2.2	Co- und posttranslationelle Regulation von Virulenzdeterminanten	12
3.3	Der nächste Verwandte: <i>C. dubliniensis</i>	15
3.3.1	Phänotypischer Vergleich von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	16
3.3.2	Genetischer Vergleich von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	17
3.3.3	Wege zur Identifizierung von pathogenitätsassoziierten Faktoren.....	19
3.4	Ziele der Arbeit	20
4	Publikationen dieser Arbeit.....	22
4.1	Manuskript 1: Die Funktion von Csr1 in <i>C. dubliniensis</i>	22
4.2	Manuskript 2: Chlamydosporen-spezifische Marker	33
4.3	Manuskript 3: Regulation der Chlamydosporenbildung	45
4.4	Manuskript 4: tRNA-Modifikationen als Virulenzdeterminante in <i>C. albicans</i>	63
5	Material und Methoden.....	93
5.1	Mikroorganismen und Medien	93
5.1.1	Verwendete <i>Candida</i> -Stämme und deren Anzucht	93
5.1.2	Verwendete Medien	94
5.1.3	Wachstumsanalysen	94
5.1.3.1	Tropftestanalysen	94
5.1.3.2	Wachstumskurven	95
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	96

5.2.1	Isolation genomischer DNA aus <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	96
5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungen	96
5.2.3	Konstruktion von <i>Candida</i> -Deletionsmutanten	97
5.2.4	Deletion der <i>C. albicans</i> Gene <i>ZCF28</i> und <i>orf19.4768</i>	98
5.3	<i>Ex vivo</i> - und <i>in vivo</i> -Infektionsmodelle	99
5.3.1	Zytotoxizitätstest	99
5.3.2	Embryoniertes Hühnerei-Infektionsmodell	99
5.4	Screening einer integrativen Bibliothek von <i>C. dubliniensis</i> DNA-Fragmenten in <i>C. albicans</i> -Klonen	100
5.4.1	Herstellung der genomischen Bibliothek	100
5.4.2	Screening der genomischen Bibliothek und Identifizierung eines morphologieassoziierten Gens	100
6	Ergänzende Ergebnisse	103
6.1	Charakterisierung der <i>C. albicans</i> Gene <i>ZCF28</i> und <i>orf19.4768</i>	103
6.1.1	Resistenz gegen Stressoren	105
6.1.2	Morphologische Tests	109
6.1.3	Biofilmbildung	112
6.1.4	Die Rolle der Gene <i>ZCF28</i> und <i>orf19.4768</i> unter infektionsassoziierten Bedingungen .	113
6.1.4.1	Infektion oraler Epithelzellen	113
6.1.4.2	Infektion embryonierter Hühnereier	114
6.2	Screening von Interspezies-Genbibliotheken zur Identifikation potentieller Virulenzfaktoren	115
6.2.1	Screening der <i>C. albicans</i> -Genbibliothek in <i>C. dubliniensis</i> auf diversen Differenzierungsmedien	115
6.2.2	Das Screening der <i>C. dubliniensis</i> -Genbibliothek in <i>C. albicans</i> demonstriert die Rolle von <i>MNN2</i> auf die Filamentierung auf Stickstoffmangelmedium	116
6.2.2.1	Identifizierung des Gens <i>CD36_10050</i> als Induktor der Filamentierung	116
6.2.2.2	Charakterisierung der <i>C. albicans</i> <i>CD36_10050</i> und <i>MNN2</i> -Expressionsmutanten unter speziesdistinktiven Bedingungen	117
7	Diskussion	120
7.1	Transkriptionskontrolle in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> am Beispiel ausgewählter Zinkfingertranskriptionsfaktoren	121

Inhaltsverzeichnis

7.1.1	Konservierte und artspezifische Funktionen des transkriptionellen Regulators Csr1 in <i>C. dubliniensis</i>	121
7.1.2	Die <i>C. albicans</i> -spezifischen Transkriptionsfaktoren Zcf28 und orf19.4768 sind wenig pathogenitätsrelevant	124
7.2	Nährstoff-induzierte Signalwege lösen unterschiedliche zelluläre und morphologische Antworten in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> aus.....	128
7.2.1	Charakterisierung struktureller und regulatoriver Komponenten der Chlamydosporulation	129
7.2.1.1	Die Chlamydosporulation geht mit einer Umstrukturierung der Zellwand einher..	129
7.2.1.2	Chlamydosporen- und Hyphenbildung nutzen dieselben zentralen Signaltransduktionswege mit morphologiespezifischen Abwandlungen	130
7.2.2	Stickstoffknappheit als Auslöser morphologischer Wechsel	132
7.2.3	Die Expression der Mnn2-Mannosyltransferase ist verknüpft mit der Filamentierung von <i>Candida</i> -Arten selbst unter repressiven Bedingungen.....	133
7.3	tRNA-modifizierende Enzyme als neuartige Virulenzdeterminanten in Hefen.....	134
7.3.1	Codons, Anticodons und deren Bindungsaffinität	134
7.3.2	Die Hma1 und Ncs2-Enzymkomplexe katalysieren entscheidende Modifikationen der tRNA-Anticodonschleife	135
7.3.3	tRNA-Modifikationen beeinflussen artspezifische morphologische Transitionen.....	138
7.3.4	Pathogenitätsrelevante Stress- und Mangelantworten bedürfen korrekter tRNA-Modifikationen.....	139
7.3.5	Komplexe Modifikationen der tRNA-Anticodonschleife sind entscheidend für die Virulenzattribute von <i>C. albicans</i> und anderer Pathogene.....	141
8	Literaturverzeichnis	144
9	Anhang.....	i
9.1	Zusätzliche Abbildungen.....	i
9.2	Abkürzungsverzeichnis	iii
9.3	Selbständigkeitserklärung	vi
9.4	Danksagung.....	vii
9.5	Übersicht über Konferenzbeiträge, weitere Publikationen und Preise	viii
9.5.1	Vorträge.....	viii
9.5.2	Posterpräsentationen.....	viii
9.5.3	Weitere Publikationen	viii

9.5.4 Preiseviii

1 Zusammenfassung

Humanpathogene Pilze gewinnen zunehmend an Bedeutung als Ursache lebensbedrohlicher, invasiver Infektionen. In einer europäischen Studie von Sepsispatienten einer Intensivstation konnten 17% der Erkrankungen auf *Candida*-Arten als mikrobielle Ursache zurückgeführt werden [1]. *C. albicans* ist das häufigste Erregerisolat aus Candidämiepatienten, deren Krankheitsverlauf mit hohen Mortalitätsraten verknüpft ist. In unterschiedlichen Risikogruppen steigt die Wichtigkeit von nicht-*albicans* Candidosen, so tritt in HIV-seropositiven Patienten *Candida dubliniensis* häufig in Mischkulturen auf [2, 3]. Obwohl *C. dubliniensis* der nächste Verwandte von *C. albicans* und ihre Genetik sehr ähnlich ist, unterscheidet sich *C. dubliniensis* durch seine verminderte Pathogenität im Mensch und Tiermodell als auch in der Kapazität zur Ausbildung morphologischer Strukturen. Für einen vollständigen Infektionsverlauf bedürfen mikrobielle Pathogene genetisch determinierter Virulenzfaktoren zur Anheftung an und Invasion von Wirtszellen und zur Dissemination im Organismus als auch Mechanismen zur effizienten Aufnahme von Makronährstoffen und Spurenelementen. Der allumspannende Anspruch der vorliegenden Arbeit war der zwischenartliche genetische und phänotypische Vergleich von *C. albicans* und *C. dubliniensis* zur Identifikation und Charakterisierung verschiedenartiger virulenzassoziiierter Faktoren beider *Candida*-Arten. Auf der Ebene der transkriptionellen Regulation wurde der Transkriptionsfaktor Csr1 in *C. dubliniensis*, durch seine Funktion in der Expressionskontrolle von Zinktransportern und einem Sequestrierungsprotein, als essentieller Regulator der Zinkhomöostase beschrieben. Das Wachstumsdefizit einer *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ*-Mutante unter Zinkmangelbedingungen konnte durch die Überexpression des putativen Hochaffinitätszinkimportergens *ZRT2* weitgehend wiederhergestellt werden. Während der orthologe Faktor in *C. albicans* unerlässlich für eine Filamentierung war [4], erscheint die Hyphenentwicklung in *C. dubliniensis* von Csr1 entkoppelt zu sein. Nichtsdestotrotz war der Verlust des Regulators an eine signifikante Verminderung der Virulenz von *C. dubliniensis* im Hühnerembryo-Infektionsmodell geknüpft.

In einem bioinformatischen Ansatz wurden die *C. albicans*-spezifischen Transkriptionsfaktoren Zcf28 und orf19.4768 ausgewählt und auf eine Rolle in artspezifischen und virulenzrelevanten Arrays untersucht. Es konnten Hinweise auf eine Mitwirkung hinsichtlich der Toleranzen gegenüber osmotischen Stress und antifungaler Azole gefunden werden, jedoch waren die Faktoren erlässlich für die *in vivo*-Virulenz und verbundener Prozesse in *C. albicans*.

In den dimorphen Hefen *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist das Vermögen der Hefe-zu-Hyphe-Transition von pathogenitätsentscheidender Bedeutung und speziesspezifische Ausprägungen sind bekannte Diskriminierungsmerkmale. Die Bildung von Chlamyosporen als dritte morphologische Struktur ist ein Mittel der klinischen Diagnostik, doch sind sowohl ihre biologische Funktionen als auch die Mechanismen zur molekulargenetischen Regulation weitestgehend unbekannt. Hier konnte das Wissen um die Chlamyosporenbildung um zahlreiche elementare Fakten erweitert werden. Vergleichende Transkriptomanalysen ergaben eine massive Hochregulation einzigartiger Zellwandproteine, welche als zelluläre chlamyosporenspezifische Marker etabliert werden konnten. In einer systematischen Untersuchung von sporulationsrelevanten Komponenten zeigten sich im

Abstract

Besonderen Regulatoren der Hyphenbildung auch in diesem morphologischen Prozess involviert. Die Initiation der Chlamydosporulation konnte als Hungerantwort kategorisiert werden, die sich durch speziesspezifische Schwellenwerte des Nährstofflimits darstellte und über den Repressor Nrg1 spezifisch vermittelt wurde.

Im Zusammenhang der nährstoffgetriebenen Entwicklungsprozesse konnte die *C. dubliniensis*-spezifische Chlamydosporen- und Pseudohyphenbildung auf Stickstoffmangelmedium durch die Integration des *C. albicans* Gens, *HMA1* (*orf19.2115*), zu einem Hefenwachstum verschoben werden. Hma1-negative *C. albicans* und *C. dubliniensis*-Mutanten zeigten Veränderungen in ihrer Rapamycinresistenz, wodurch ein Wirken durch den nährstoffsensitiven TOR-Signalweg postuliert wurde. Eine deutliche Verkürzung der Filamente trat nur in den *C. albicans hma1Δ/Δ*-Mutanten auf, die auf oralen Zellen mit einer verminderten Adhärenz und Invasivität korrelierte und in der Attenuierung im Infektionsmodell embryonierter Hühnereier mündete. Mittels Analysen von orthologen Faktoren in *Saccharomyces cerevisiae* konnte *C. albicans* Hma1 als Threonylcarbamoyladenosen-Dehydratase klassifiziert werden, die spezifisch Adeninmoleküle in direkter Nachbarschaft von NNU-Anticodons modifiziert und direkt die Effizienz und Leserahmengenauigkeit der Translation verstärkt [5, 6]. *In silico*-Genontologieanalyse konnten morphologie- und virulenzassoziierte Transkriptionsfaktoren als reich an ANN-Codons vorhersagen, worauf sich die destruktiven Phänotypen begründen könnten.

Die große Bedeutung von enzymatischen tRNA-Modifizierern in pathogenen Hefen bestätigte sich auch in der Analyse von Ncs2, welches an der Sulfidierung von Wobblebasen beteiligt ist. In Analogie zeigten sich auch hier weitreichende Einschränkungen in der Filamentierung und der Schädigung von humanen Zelllinien. Resümierend konnte hier erstmals die exakte Komposition von tRNA-Basenmodifikationen als ein vollkommen neuartiger, epigenetischer Pathogenitätsmechanismus für pilzliche Humanpathogene beschrieben werden.

2 Abstract

Invasive, life-threatening mycoses gain a frightening impact as they cause worldwide far more than two million infections each year and mortality rates reach levels of 70% and above [7]. A European meta-analysis of sepsis patients detected *Candida* spp. as causative agents in 17% of all cases [1]. Truly, *Candida albicans* is the most frequent isolate in terms of candidemia, but by determination of several risk cohorts non-*albicans* species rise in importance. Severely immunocompromised HIV-infected individuals often suffer from co-infections with *Candida dubliniensis* strains [2, 3].

Genetically, *C. dubliniensis* is the closest known relative of *C. albicans*, whereas they share a number of phenotypic traits, including the ability to form true hyphae and chlamydospores. Both sister species are opportunists with the potential to infect human hosts, but *C. dubliniensis* is infrequently found in patients suffering from critical medical conditions. Its lower virulence is strikingly reflected in animal infection models and its specifically reduced propensity in hyphal development and higher stress susceptibilities are the supposed underlying mechanisms. The aim of the study encompasses the

identification of novel pathogenicity factors in terms of morphological transitions and the cellular response to starvation by cross-species comparisons.

The battle for nutrients and trace elements between host and microbial pathogens is crucial in infection development. As transcriptional adaptations occur fast in response to environmental changes like starvation, transcription factors were selected regarding their potential species-specific character. With this view the transcriptional regulator Csr1 was analyzed in *C. dubliniensis* and an evolutionary conserved function in zinc homeostasis was confirmed. A transcriptional deregulation of its target genes, including zinc transporters and a zinc scavenger, resulted in a growth defect of a *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* mutant in low zinc media. This deficiency was restored by an artificial overexpression of the putative high affinity zinc importer gene *ZRT2*. While, Csr1 is essential for hyphae formation in *C. albicans* [4], virulence but filamentation was coupled with *CSRI* knockout in *C. dubliniensis*.

Further comparative *in silico* screenings revealed *ZCF28* and *orf19.4768* to be *C. albicans*-unique. Phenotypic characterizations of deletion and heterologous expression mutants showed minor alterations in resistance towards osmotic and azole stresses, but no deeper influence in virulence-required pathways was found and their supposed role in *C. albicans*-specific pathogenicity was negated.

Yeast-to-hyphae transition is the most popular virulence feature in dimorphic *Candida* spp. however; the biological function of chlamydo spores as further morphological structures remains mainly obscure. Here, first transcriptome assays of chlamydo spores uncovered a significantly rearrangement of the sporal cell wall components, which were applied to serve as specific cellular marker molecules. In a systematic approach, key factors of TOR- and cAMP-driven pathways mostly controlled the development of both: hyphae and chlamydo spore formation. Even so, factors with a unilateral range of functions were discovered. The most important criterion of chlamydo spore induction was the availability of short saccharides or peptone, whose signal thresholds appeared to be species-specific. Here, an even minimal supplementation with nutrients blocked specifically chlamydo sporulation of *C. albicans*: a process governed by the transcriptional key repressor Nrg1.

For deeper understanding of the relation between starvation and *C. dubliniensis*-specific chlamydo spore formation, a genomic library of *C. albicans* DNA-fragments was heterologously integrated into *C. dubliniensis* and transformants with a diminished sporulation were isolated. Gene expression of *HMA1* was confirmed to strengthen yeast cell growth under nitrogen limitation and a gene deletion affected resistance to the TOR-antagonist rapamycin in both *Candida* species. Solely a *C. albicans* *hma1Δ/Δ* deletion mutant exhibited a pronounced hyphae shortening accompanied by reduced adherence and invasion of human oral cells. These phenotypical deficiencies resulted in a significantly attenuated virulence in an infection model of embryonated chicken eggs. In relation to its orthologous factor in *Saccharomyces cerevisiae* Hma1 was unveiled to bear tRNA threonylcarbamoyladenosine dehydratase activity in *C. albicans*. Thus, Hma1 modifies specific adenosine bases adjacent to NNU-anticodons and thereby it enhances translational stacking accuracy, maintenance of frameshift events and ribosomal reading speed [5, 6].

Einleitung

Since the cyclic *N*⁶-threonylcarbamoyladenine *m*⁶A modification exclusively touches genes rich in ANN-codon stretches and *in silico* analysis of ontology terms predicted a particular enrichment of transcription factors; including such essential for morphology and direct virulence which substantiate distinctive disabilities after *m*⁶A loss.

In order to emphasize the importance of proper tRNA-modifications for a full virulence expansion in fungal pathogens, Ncs2 as a second base modifier was evaluated. The mediated thiolation targets a uridine residue at the tRNA wobble base. Virulence-related phenotypes of *C. albicans* mutants lacking one of either tRNA-modifications showed broad overlaps in hyphal underdevelopment and impaired infection capacities of human epithelial cell lines. In conclusion, this study is pioneer to illustrate the importance of proper tRNA modification patterns for epigenetic regulation of virulence factors in human fungal pathogens.

3 Einleitung

3.1 Pilze als Krankheitserreger

Pilze sind eukaryotische Lebewesen, die sich von Tieren und Pflanzen durch ihre heterotrophe Lebensweise, Glucogen als Kohlenhydratspeichersubstanz, eine chitinhaltige Zellwandstruktur und den α -Aminoacidat-Weg zur Lysinbiosynthese abgrenzen [8]. Weltweit sind etwa 3 - 5 Millionen Pilzarten bekannt, von denen etwa 600 Vertreter fähig sind Infektionskrankheiten beim Menschen auszulösen [9, 10]. Dabei ist im Vergleich zu den vielfältigen Erregern bakterieller und viraler Infektionen die Anzahl der häufig isolierten, pilzlichen Krankheitserreger auf 15 Arten beschränkt [11]. Auch aus diesem Grund werden invasive fungale Erkrankungen häufig unterschätzt und oftmals spät diagnostiziert. Zudem erschweren die wenigen zur Verfügung stehenden Klassen an Antimykotika die Therapie, wodurch Mortalitätsraten über 50% keine Seltenheit sind [7].

Anhand der Infektionsquelle lassen sich exogene und endogene Mykosen unterscheiden. Erstere umfassen Pathogene wie *Histoplasma capsulatum*, Aspergillen und Cryptococci, die in der Umwelt vorliegen und von dort potenziell den menschlichen Wirt infizieren können. Während die meisten Vertreter dieser Gruppe als opportunistische Erreger ausschließlich eine Infektion in immungeschwächten Personen hervorrufen kann, sind einzelne exogene Pilze wie *Cryptococcus gattii* auch in der Lage immunkompetente Menschen zu infizieren [12].

Die meisten Fälle invasiver und disseminierter Pilzinfektionen sind jedoch endogenen Ursprungs und treten in Abhängigkeit des wirtlichen Immunstatus auf. Der menschliche Wirt und andere Warmblütler beherbergen eine Vielzahl kommensaler Mikroben auf der Haut, den Schleimhäuten, im Darm und Urogenitalsystem, die im Einklang mit der natürlichen Mikrobiota als auch dem Wirtsimmunsystem stehen. Durch Veränderungen der immunologischen Kapazität oder einer Dysbalance der mikrobiellen Gemeinschaft kommt es zum Überwachsen durch einzelne Subpopulationen, welche Epithelbarrieren schädigen und diese so durchqueren können [13, 14]. Die opportunistisch Pathogenen durchlaufen dabei einen Wechsel vom kommensalen zum pathogenen Stadium. Selbst als apathogen beschriebene Arten wie Subtypen der Bäckerhefe

Saccharomyces cerevisiae können unter diesen Umständen invasive Pilzinfektionen ähnlich einer Candidiasis auslösen. Neben den endogenen *S. cerevisiae*-Quellen zählen häufig kontaminierte Lebensmittel, Nahrungsergänzungsmittel oder intravenöse Medizinprodukte zu den Infektionsgründen und betroffene Patienten leiden meist an schwerwiegenden Vorerkrankungen des Verdauungstrakts [15, 16].

3.2 *Candida albicans* als Pathogen

Der Hefepilz *Candida albicans* ist ein häufiger und normalerweise harmloser Kommensale oraler, gastrointestinaler und urogenitaler Schleimhäute des gesunden Menschen [13, 17]. Störungen der Wirtsabwehr, wie Veränderungen der intestinalen Mikrobiota und der Schleimhautimmunität, können zu einer *Candida*-Infektion führen [18]. Es wird angenommen, dass der Erreger damit einhergehend sein Transkriptom ändert und pathogenitätsassoziierte Faktoren exprimiert (siehe Abschnitt 0).

Mit einer Infektionsrate von jährlich weltweit 400.000 Individuen ist *C. albicans* einer der drei klinisch bedeutsamsten Erreger lebensbedrohlicher, disseminierter Mykosen [7], und in der Summe bilden *Candida*-Arten die vierthäufigste Ursache aller nosokomialen Blutstrominfektionen in den Vereinigten Staaten [19]. Im Zuge dieser systemischen Infektionen kann *C. albicans* fast alle Organe kolonisieren und Multiorganversagen verursachen [20]. Trotz der Entwicklung neuartiger Antimykotika verbleiben die Mortalitätsraten invasiver Candidosen mit 37-44% auf einem hohen Niveau, welches viele bakterielle und virale Infektionen übertrifft [21, 22]. Systemische *Candida*-Infektionen sind mit Störungen der zellulären Immunität assoziiert, und sie treten gehäuft in den folgenden immungeschwächten Risikogruppen auf: Patienten mit längerem Aufenthalt auf einer Intensivpflegestation, untergewichtige Neugeborene, Empfänger von Organtransplantation, Patienten unter Breitbandantibiotikatherapie, Chemotherapie, mit Langzeitkathetern oder mit vorliegenden HIV-Infektionen/AIDS-Erkrankungen [21, 23]. Viele Behandlungsmöglichkeiten der modernen Medizin vergrößern die Kohorte immunsupprimierter Patienten, wodurch Erkrankungen durch opportunistische Pathogene fortschreitend an Relevanz gewinnen [7, 24].

Während systemische Candidosen bis auf seltene Ausnahmen [25] nur bei immunsupprimierten Wirten und bei geschädigten Epithelbarrieren in Folge von Operationen oder Polytrauma [26] auftreten, ist die Verbreitung oberflächlicher mukosaler Infektionen auch in immunkompetenten Bevölkerungsgruppen hoch. Neben Candidosen des Oropharynx, des Ösophagus, der Haut und Nägel sind Vaginalmykosen von großer klinischer Relevanz, da bis zu 75% aller Frauen im gebärfähigen Alter mindestens einmalig eine Vulvovaginitis-Episode erfahren und diese in 5-8% der Patientinnen rezidivieren [27, 28].

3.2.1 Verlauf einer *C. albicans*-Infektion und deren Pathogenitätsmechanismen

Der Wechsel vom kommensalen zum pathogenen Status beruht auf einer Vielzahl genetisch-determinierter Faktoren, die in Abhängigkeit der Umgebung exprimiert werden, um das Überleben und die Verbreitung im Wirt zu gewährleisten.

Sowohl während der kommensalen Phase als auch im ersten Schritt einer *C. albicans*-Infektion ist die Adhärenz an die Wirtsoberfläche oder künstliche Träger, wie Silikonkatheter, entscheidend. Den

Einleitung

molekularen Prozess der Anheftung vermittelt unter anderem die wichtige Genfamilie der ALS-Adhäsine, die über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellwand oder Membran verankert sind und durch Agglutinin-ähnliche Proteindomänen die Bindung an Glucoproteine vermitteln [29]. In der polymorphen Hefe *C. albicans* ist die Expression von mehreren Virulenzfaktoren, wie beispielsweise der Adhäsine Hwp1 und Als3, an die Initiation der Hyphenbildung gekoppelt [30].

Diese Invasion in das Wirtsgewebe kann über aktive Penetration direkt durch die Hyphen erfolgen oder über den Mechanismus der induzierten Endozytose durch die Wirtsepithelzellen vermittelt werden [31]. Während Adhärenz- und teilweise Invasionsprozesse wahrscheinlich auch während des Kommensalismus auftreten, ist die Schädigung des Wirtsgewebes charakteristisches Merkmal einer *C. albicans*-Infektion. Die Ursachen der Wirtszellschädigung sind dabei mannigfaltig: Neben dem mechanischen Eindringen von Hyphen [31] können Zellmembranen hydrolytisch durch Proteasen oder Lipasen [32] oder durch das Toxin Candidalysin [33] angegriffen werden, und die Integrität der Wirtszellen und damit des Gewebes beeinträchtigen.

3.2.1.1 Polymorphismus

Polymorphe Pilze vereint die Eigenschaft zwischen mehreren morphologischen Wachstumsformen in Abhängigkeit der Umwelt reversibel wechseln zu können. Diese Veränderungen in der Zellform können durch vielseitige Reize, einschließlich Temperaturänderungen, des pH-Werts und der Konzentrationen an Sauerstoff oder Nährstoffen, induziert werden [34-36].

C. albicans ist dazu in der Lage in Form von Hefezellen, Pseudohyphen und echten Hyphen zu wachsen (Abbildung 1). Zudem treten morphologische Sonderformen wie die kreuzungskompetenten Opaque-Zellen und die Chlamydosporen auf [37].

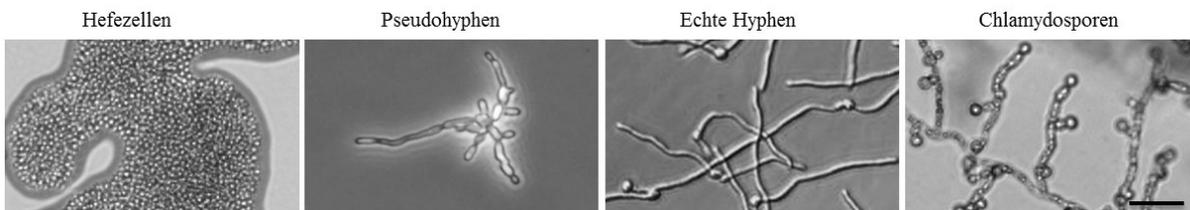


Abbildung 1 Überblick ausgewählter morphologischer Wachstumsformen von *C. albicans*. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Morphologien: Hefezellen, Pseudohyphen, echte Hyphen und Chlamydosporen an Pseudohyphen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Bilder: diese Arbeit.

Der Übergang von einzelligen Hefezellen (vormals auch Blastosporen genannt) zum filamentösen Wachstum geht mit einer Umstrukturierung des Aktinskeletts einher [38]. Während echte Hyphen gerichtet den apikalen Vesikelkomplex des Spitzenkörpers entlang wachsen [39], entstehen die ovalen Tochterzellen von Hefen anfangs durch polares Wachstum, doch erfolgt die spätere Zunahme der Zellgröße isotropisch. Pseudohyphen stellen eine dritte morphologische Form dar, deren Entstehung der Hefezellen ähnelt, aber die initiale polare Wachstumsphase länger anhält und in langgestreckte, elliptische Zellen mündet [40].

Die Übergänge zwischen den Wachstumsformen Hefe und Hyphe sind essentiell während der Pathogenese von *C. albicans*, denn ein Verlust der Hyphenbildung und hyphenassoziierter Faktoren geht häufig mit einer Virulenzreduktion oder der Apathogenität des entsprechenden Stammes einher

[34, 41]. Echte Hyphen werden als invasive Form angesehen, da sie Epithelbarrieren durchbrechen können oder zum Ausbruch aus Makrophagen nach Phagozytose von Hefezellen beitragen [42]. Wegen der zentralen Bedeutung der Hyphenbildung wird diese genetisch und posttranslational streng kontrolliert. Verschiedene äußere Reize, einschließlich einer Temperatur von 37 °C, der Verfügbarkeit an Glucose und Stickstoffquellen, Serum, CO₂ und einem leicht alkalischen Milieu [43], entscheiden über die Einleitung zellulärer Signalkaskaden, die letztlich Transkriptionsfaktoren hyphenassoziierter Gene aktivieren. Wesentlich ist der cAMP-Proteinkinase A (PKA)-Signalweg, welcher über hohe CO₂-Konzentrationen, die Anwesenheit von Serum und verfügbarer Kohlenstoffquellen, vor allem Glucose, induziert wird [35, 44, 45]. Eine Stickstoffhungerantwort, die ebenfalls Filamentierung unterschiedlicher Hefen hervorruft, verläuft hingegen über den Cek1-MAP-Kinase-Weg und den Nährstoff-regulierten TOR-Signalweg [46-48]. Eine pH-Wert-abhängige Regulation erfolgt zudem über den Transkriptionsfaktor Rim101, der den morphologischen Repressor Nrg1 unterdrückt und dadurch die Hypheninduktion unter alkalischen Bedingungen vermittelt [49]. Die einzelnen Signaltransduktionswege sind nicht voneinander isoliert, und durch gemeinsame Faktoren und deren Querverknüpfungen entstehen viele Überlappungen zwischen den Signalwegen [35]. Beispielsweise aktiviert die zentrale Ras1-GTPase zugleich downstream-Komponenten des cAMP- und MAPK-Weges [50], und während die Initiation der Hyphenbildung an einen temporären cAMP-Peak gekoppelt ist, bedarf die Aufrechterhaltung des Signals zur Hyphenverlängerung einer reduzierten TOR-Aktivität [51].

Chlamydosporen können als vierte morphologische Kategorie von *C. albicans* aufgefasst werden. Bei diesen Strukturen handelt es sich um kugelförmige, stark ummantelte Zellen, die terminal über eine Suspensorzelle mit Hyphen oder Pseudohyphen verknüpft sind. Mit einem Durchmesser von bis zu 10 µm erreichen sie die zwei- bis dreifache Größe einer Hefezelle [52]. Charakteristische Komponenten sind ein hoher Lipid- und RNA-Gehalt im Zellinneren und eine β-1,3-Glucan-reiche äußere Zellwand [53]. Zur Induktion der Sporulation werden nährstoffarme Festmedien genutzt, die oftmals stärkehaltige Pflanzenextrakte und Detergenzien enthalten [54, 55], die Inkubationstemperatur liegt bei ca. 27 °C oder Raumtemperatur [56], und ein Ausschluss von Tageslicht gilt als wichtiger stimulierender Faktor [57]. Zudem wird der Prozess durch Nährstoffmangel, insbesondere niedrigen Glucosekonzentrationen und im geringen Maß Stickstoffkonzentrationen, unterstützt [58, 59]. In der *C. albicans*-Diagnostik ist die Bildung von Chlamydosporen ein häufig genutztes und zuverlässiges Merkmal zur Unterscheidung von anderen *Candida*-Arten [60], jedoch waren zu Beginn dieser Arbeit nur wenige molekulare Regulatoren dieses Prozesses bekannt. Im Gegensatz zum Hefe-Hyphe-Dimorphismus ist die Rolle dieser morphologischen Strukturen im Verlauf von Candidosen zudem kaum untersucht. Jedoch wurden auch hyphen- und virulenzassoziierte Gene wie *EFG1*, *SCH9* und *RIM101* als essentiell während der Chlamydosporulation von *C. albicans* beschrieben [55, 61]. Die Schwesternart *C. dubliniensis* (siehe auch Abschnitt 3.3) ist die einzige Nicht-*albicans*-Art, die auch in der Lage ist Chlamydosporen zu produzieren – und dies sogar in einem größeren Maß als *C. albicans* [60, 62]. Während die Ursachen der spezifischen Filamentierung unter anderem in Unterschieden der TOR-Kaskade sowie Efg1- und Ume6-getriebenen Wegen liegen [63-65], ist Nrg1 der bisher einzig

bekannter Faktor, der sowohl die Hyphenbildung von *C. dubliniensis* als auch die Chlamydosporulation in *C. albicans* reguliert [62, 66]. Chlamydosporen existieren auch in anderen pathogenen Pilzen, und obwohl sie sich strukturell ähneln, sind ihre funktionellen Eigenschaften divers. So stellen sie in Dermatophyten klassische Überdauerungsformen unter Hunger- und Stressbedingungen dar [67]. In *Cryptococcus neoformans* fungieren sie nicht als Speicherstrukturen, vielmehr wird ihre Rolle im sexuellen Zyklus diskutiert [68]. Im Gegensatz dazu ist bei der diploiden Hefe *C. albicans* bisher kein vollständiger sexueller Zyklus bekannt und sie wird der Gruppe *Fungi imperfecti* zugeordnet [69], obwohl eine haploide Form und ein pseudosexueller Zyklus beschrieben wurden [70]; jedoch ist die Chlamydosporulation ein asexueller Prozess. Da Chlamydosporen von *C. albicans* auch keine charakteristischen Merkmale von typischen Verbreitungssporen, wie eine erhöhte Stressresistenz oder Langlebigkeit, aufweisen, bleibt ihre biologische Funktion bislang unbekannt [52, 60].

3.2.1.2 „Nutritional Immunity“

Neben der Morphologie ist die Fähigkeit, ausreichend Nährstoffe und Spurenelemente aus der Wirtsumgebung aufzunehmen ein wichtiger Virulenzfaktor pathogener Mikroorganismen. Die Hälfte der Gesamtzahl aller Enzyme und anderer Proteine in der Zelle benötigen Spurenelemente, wie die Metalle Zink und Eisen, als Cofaktoren für ihre volle Funktionalität [71]. Während einer Infektion stehen Mikroorganismen und Wirtszellen dadurch im stetigen Wettstreit um verfügbare Nährstoffe. Nur eine effiziente Nährstoffaufnahme des Pathogens ermöglicht eine beständige Proliferation. Der gezielte Nährstoffentzug durch den Wirt wird auch als „Nutritional Immunity“ bezeichnet [71, 72], da es ähnlich dem Immunsystem der Vermehrung von Pathogenen entgegenwirken kann. Beispielsweise binden Vertebraten ihren Eisenvorrat in Häm-Molekülen, welche weiter an Globuline gebunden und/oder in Erythrozyten gespeichert werden. Dadurch wird die Verfügbarkeit von Eisen effektiv minimiert, und Pathogene müssen Strategien zur Eisengewinnung, wie zum Beispiel Erythrozytenhämolyse und Spaltung von Pyrrolringen, entwickeln, um wachsen zu können [72]. Der Begriff der „Nutritional Immunity“ schließt auch die lokale Anreicherung von Mikronährstoffen in hohen und dadurch toxischen Konzentrationen ein. Arbeiten mit *Mycobacterium tuberculosis* zeigten nach der Phagozytose eine hochdosierte, intrazelluläre Freisetzung von Zinkionen in den Phagolysosomen der Makrophagen. Darauf reagieren die Bakterien mit einer raschen Aktivierung von Zinkexportsystemen, so dass Effluxsysteme hier als essentielle Virulenzfaktoren gelten können [73].

Die Keimschlauchbildung von *C. albicans* ist an eine erhöhte Expression von hyphen- und virulenzassoziierten Genen geknüpft, zu welchen auch Faktoren für die Aufnahme von Mikronährstoffen gehören. Zur Aufrechterhaltung der Metallhomöostase exprimiert *C. albicans* beispielsweise die Hämoglobinrezeptoren Rbt5/Rbt51, die der Internalisierung und Verwertung dieser Eisenquelle dienen [74]. In einem weiteren pathogenitätsrelevanten Prozess wird Ferritin, der wichtigste eisenspeichernde Proteinkomplex epithelialer Zellen, durch das hyphenassoziierte Invasin Als3 auf der Oberfläche von *C. albicans* gebunden [75]. Neben Eisen ist Zink eines der wichtigsten essentiellen Metalle, welches als Cofaktor an 10% der humanen Proteine gebunden ist [76]. Im Vergleich zu Eisen und Mangan ist die Bioverfügbarkeit von Zink im menschlichen Körper noch geringer [77]. Auch für Pathogene stellt Zink einen bedeutsamen Cofaktor für Metalloenzyme dar; so

haben drei der sechs Superoxiddismutasen von *C. albicans* ein bimetallisches Zentrum und sind kupfer- und zinkabhängig [78, 79]. Im humanen Wirt exkretieren neutrophile Granulozyten bei Infektion das antimikrobielle Peptid Calprotectin, welches Zink und andere Metallionen im extrazellulären Raum sequestriert [80]. Andererseits nutzen Pathogene eigene sekretorische Zinkbindenden Proteine und Hochaffinitätstransportsysteme, wie die ZnuABC-Transporterfamilie gramnegativer Bakterien, um eine effiziente Metallaufnahme zu ermöglichen [81]. Auf evolutionär konservierte Art wird in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und diversen pathogenen Pilzen die Zinkhomöostase unter restriktiven Bedingungen durch den Transkriptionsfaktor Csr1 bzw. das Homolog Zap1 reguliert [82]. Diese Aktivatoren steuern die Expression membranständiger Zinkimporter und sekretorischer zinkbindender Proteine (Zinkophore); zudem regulieren sie die Mobilisierung intrazellulärer Zinkspeicher [4, 83]. Wird die Zinkaufnahme in verschiedenen pathogenen Bakterien und Pilzen unterbunden, führt dies stets zu einer Verminderung oder dem Verlust der mikrobiellen Pathogenität [77, 84-86]. In *C. albicans* ist Csr1 von multifaktorieller Bedeutung: neben der Zinkhomöostase reguliert es positiv die Filamentierung, die Zell-Substrat-Adhärenz, die Biofilmbildung, sowie die Freisetzung des Quorum Sensing Moleküls Farnesol [4, 87-89].

3.2.2 Regulation von Pathogenitätsfaktoren

Opportunistische Krankheitserreger sind meist Generalisten, die im Gegensatz zu Spezialisten oft in der Lage sind, viele verschiedene Nischen, unter anderem im Wirt, zu besiedeln. Bei längerfristigen Adaptationsprozessen ist eine genomische Anpassung nicht selten. Durch den parasexuellen Lebenszyklus von *C. albicans* kommt es häufig zu Chromosomenverdopplungen und es treten unterschiedliche chromosomale Ploidie-Stadien auf, einschließlich Tetra-, Haplo- und Aneuploidie [70, 90]. Diese genomische Flexibilität ermöglicht eine vergrößerte phänotypische Varianz und Anpassungsfähigkeit innerhalb einer Subpopulation [70]. Für einen raschen Nischenwechsel bzw. einen Wechsel zu einer pathogenen Phase zeigen Mikroorganismen eine Plastizität, die mit einer Änderung des Phänotyps ohne genotypische Veränderungen einher geht [91]. Bei *C. albicans* handelt es sich zum Beispiel um die Expression von dimorphismus- und virulenzassoziierten Faktoren, die den Beginn und das Voranschreiten der infektiösen Phase ermöglichen. Neben der transkriptionellen Regulation sind auch posttranskriptionelle, cotranslationelle und posttranslationelle Mechanismen beteiligt.

3.2.2.1 Transkriptionelle Regulation von Virulenzdeterminanten

Eine polytrope Proteinbiosynthese ist ein wichtiger Teil der mikrobiellen Plastizität, und sie wird bestimmt durch eine Reihe gekoppelter Prozesse, beginnend mit der Transkription, Prozessierung und Degradierung von mRNA über die Translation, Lokalisation und Modifikation von Proteinen bis hin zu ihrer finalen gezielten Degradierung. Eine Übersicht der wichtigsten Regulationsmechanismen mit entsprechenden Beispielen ist in Abbildung 2 dargestellt.

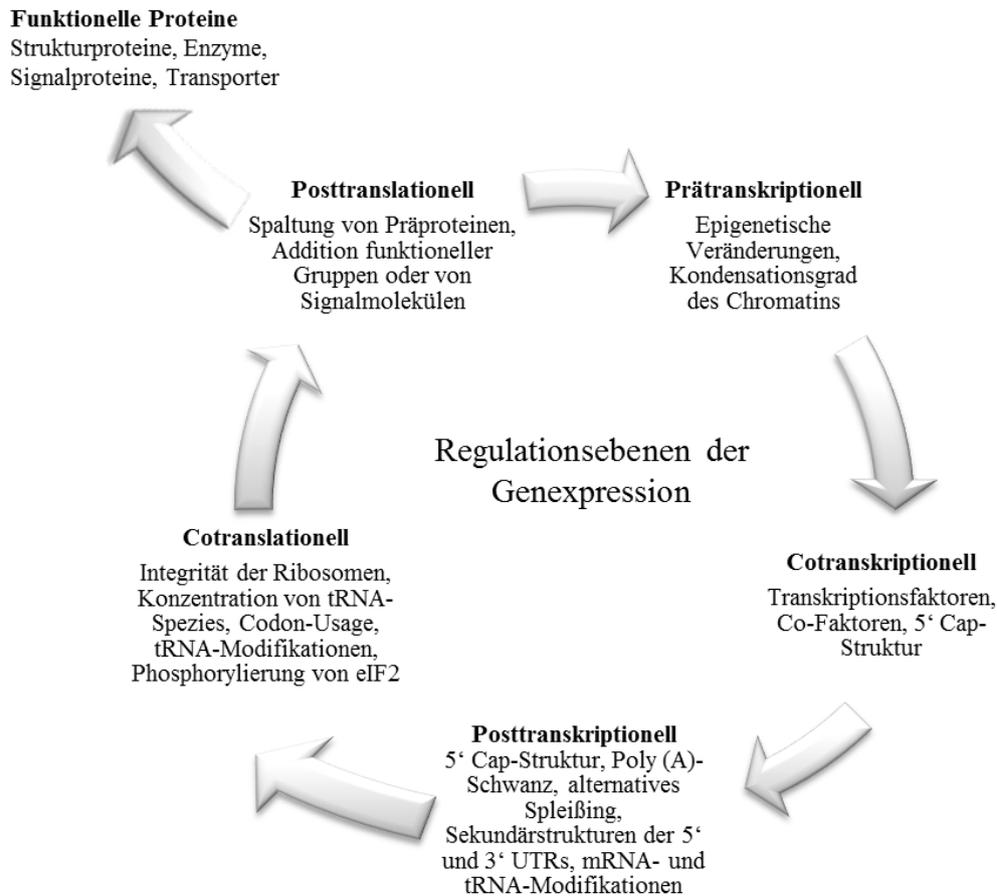


Abbildung 2 Die eukaryotische Genexpression wird auf verschiedenen Stufen reguliert. Die Proteinbiosynthese gliedert sich grob in Transkription und Translation, und beide Prozesse werden durch prä-, co- und postregulative Mechanismen beeinflusst. Manche Faktoren haben überlappende Funktionen - so wird die 5'-Cap-Struktur bereits cotranskriptionell an den naszierenden mRNA-Strang geknüpft und posttranskriptionell hat sie zusammen mit dem Poly-(A)-Schwanz einen großen Einfluss auf die Halbwertszeit der mRNA. tRNA-Moleküle werden selbst posttranskriptionell modifiziert, aber ihre Funktion kommt bei der Translation zu tragen. Des Weiteren wird die Aktivität mancher Transkriptionsfaktoren ebenso wie epigenetisch wirksamer Enzyme, wie Histondeacetylasen, durch posttranslationelle Modifikationen bestimmt [92], was den Ring zur prätranskriptionellen Wirkung schließt.

Die Transkription bei eukaryotischen Zellen lässt sich anhand der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in drei Klassen einteilen. Die RNA-Polymerase I transkribiert ribosomale (r)DNA-Gene, Klasse II bildet Boten- (m)RNA und Klasse III produziert Transfer- (t)RNA und weitere kleine RNAs. Für die Transkriptionsinitiation sind eine Reihe von Hilfsfaktoren notwendig, die charakteristische Promotorelemente erkennen. Die RNA-Polymerase II erkennt vergleichsweise viele Sequenzvariationen innerhalb der Promotoren, und sie arbeitet mit einer hohen Anzahl von DNA-bindenden Cofaktoren zusammen. Neben den konstitutiven upstream-Faktoren und induzierbaren Response-Elementen stellen allgemeine Transkriptionsfaktoren einen basalen Bestandteil des Transkriptionsapparats dar, indem sie oft aktivierend, aber auch reprimierend auf die Transkriptionsinitiation einwirken. Anhand ihrer DNA-Bindedomäne werden Transkriptionsfaktoren

klassifiziert, und zu den bekannten Strukturdomänen gehören Helix-turn-helix, Helix-loop-helix, Homöodomänen und Leucin-Zipper [93]. In Ascomyceten kommen die C_2H_2 -Zinkfinger und $Zn(II)_2Cys_6$ -Transkriptionsfaktoren überdurchschnittlich häufig vor [94]. Einzelne Zinkfinger haben eine Cystein- bzw. Cystein-Histidin-reiche Konsensussequenz, die wiederholt in einem Fingerprotein auftritt. Diese Motive reihen sich zu einer tetraedrischen DNA-bindenden Sekundärstruktur, in dessen Zentrum Zinkionen komplexiert sind [95]. Beispiele für Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren in *Candida*-Arten sind Mitglieder der *ZCF*-Genfamilie, die das pilzspezifische Zn_2Cys_6 -Motiv [96] tragen, und der Csr1-Transkriptionsfaktor mit sieben C_2H_2 -Elementen, der als zentraler Regulator die Zinkhomöostase in *C. albicans* steuert [4, 88].

Eine nischen- und gewebespezifische Expression einzelner Fitness- oder Virulenzfaktoren ermöglicht *C. albicans* eine bestmögliche Anpassung an unterschiedliche Wirts- und Umweltbedingungen. Die rasche Genexpression durch die Aktivierung oder Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren ist ein zentrales Element zur Kontrolle der Stressantwort, Morphologie und weiterer Virulenzfaktoren in *C. albicans* [97]. Mechanismen der Transkriptionskontrolle werden exemplarisch anhand der Genfamilie der sekretorischen Aspartat-Proteasen (*SAP1-10*) dargestellt: Analysen der Expressionsprofile zeigten eine erhöhte *SAP5*-Expression in der ersten Phase einer intraperitonealen Infektion von Mäusen, während *SAP2* erst für das spätere Stadium der Dissemination in die Leber bedeutsam war [98]. Durch unterschiedliche Erkennungsmotive in den Promotorsequenzen werden einzelne *SAP*-Gene über verschiedene Transkriptionsaktivatoren gesteuert. Somit führte eine Deletion der Transkriptionsfaktoren *EFG1* und *CPH1* zum Erliegen der *SAP5*-Expression, während *SAP2* und weitere *SAP*-Gene nicht beeinträchtigt wurden [99].

In den meisten Fällen korreliert die Transkriptionsrate mit der Menge an mRNA im Cytoplasma. Jedoch haben mRNAs unterschiedliche Halbwertszeiten, und posttranskriptionelle Mechanismen, vor allem die Ausbildungen der 5'-Cap-Struktur und des Poly-(A)-Schwanzes, beeinflussen die mRNA-Stabilität und verändern den Pool an mRNAs, die zur Translation zur Verfügung stehen. So führt in *C. albicans* eine Veränderung von mRNA-Modifikationen durch den Verlust der Ccr4-Pop2 mRNA-Deadenylase zu einem verminderten Filamentationsvermögen und einer eingeschränkten Virulenz im murinen intravenösen Candidämie-Modell [100].

3.2.2.2 Co- und posttranslationelle Regulation von Virulenzdeterminanten

Auf der nächsten Stufe der Regulation stehen translationelle und posttranslationelle Prozesse: Nicht alle mRNA-Transkripte werden translatiert, und manche Proteine haben kurze Halbwertszeiten. Tatsächlich gibt es eine Korrelation der Konzentrationen von kodierender mRNA und kodiertem Protein in der Zelle, jedoch ist diese nur recht schwach ausgeprägt [101]. Diese bedingte Übereinstimmung von Transkriptom- und Proteomdaten basiert auf Regulationsmechanismen der Translation und ihren Folgeprozessen.

Die Regulationsmechanismen, die den eukaryotischen Translationsprozess kontrollieren, betreffen oft die Initialisierung und umfassen unter anderem die Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten im Zusammenspiel verschiedener Elongationsfaktoren, im Besonderen eIF2 bis 4 [102]. Exakte Nukleosidmodifikationen sind bestimmend für die Stabilität und Funktion von DNA und RNA-Spezies. Die beidseitig terminalen Modifikationen der mRNA treten in Wechselwirkung mit transagierenden Elementen der Ribosomenkomplexe, wodurch die Translationseffizienz und mRNA-Halbwertszeiten gesteuert werden [103].

Bei der Translation stellen Transfer-RNAs (tRNAs) sowohl die physikalischen Verbindungselemente als auch die Dekodierer zwischen der Information von Nukleotidsequenzen (mRNA) und Aminosäuren dar, die letztlich funktionelle, strukturelle und/oder katalytisch aktive Proteine bilden.

Ein tRNA-Strang besteht aus 73 bis 95 Nukleotiden, deren Sekundärstruktur sich in vier Schleifen aufteilt. Das charakteristische tRNA-Kleeblatt besteht aus einer Dihydrouracil-, einer TΨC (Pseudouridin)-, einer variablen und der Anticodonschleife (Abbildung 3). Eine typische Hefezelle beherbergt etwa 3 Millionen tRNA-Moleküle [104], wobei die Anzahl einzelner tRNA-Spezies variiert. Wahrscheinlich korreliert die translationelle Elongationsgeschwindigkeit mit der Anzahl cognater tRNAs. So werden hoch exprimierte Gene, wie die der rDNA, vermehrt durch besonders häufig auftretende tRNA-Arten enkodiert [105]. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Basenmodifikation der tRNA: Allein 90 der 150 bekannten Nukleotidmodifikationen sind für tRNAs charakteristisch, und 1-10% der Gene eines typischen Genoms kodieren für tRNA-modifizierende Enzyme, wodurch ihre Anzahl höher ist als jene der tRNA-Gene selbst [106, 107]. Die hohe Variabilität der Modifikationen erlaubt die Erfüllung vielfältiger Funktionen, einschließlich der Bildung von molekularen Sekundärstrukturen sowie der tRNA-Interaktionen mit mRNA-Codons, Ribosomen, Translationsfaktoren und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen [106-109]. Bedeutsam sind oft konservierte Basenmodifikationen in der Region des Anticodons (ASL: Anticodonschleife) an den Nukleotidpositionen 34 und 37, da sie die Codon-Anticodon-Paarungseigenschaften determinieren [110-112]. Dabei wirkt sich eine erhöhte Bindungsaffinität positiv auf die Translationsgeschwindigkeit und -effizienz aus [107]. Modifikationen an der Wobble-Position (Nukleotid 34 der tRNA) erhöhen zudem die Wahrscheinlichkeit von nicht-cognaten Bindungen und sie erlauben eine cotranslationelle Anpassung an rasch wechselnde Umweltbedingungen [113], beispielsweise durch die gezielte Steigerung der Biosynthese von Aminosäuresynthese-Enzymen unter Nährstoffmangel [112].

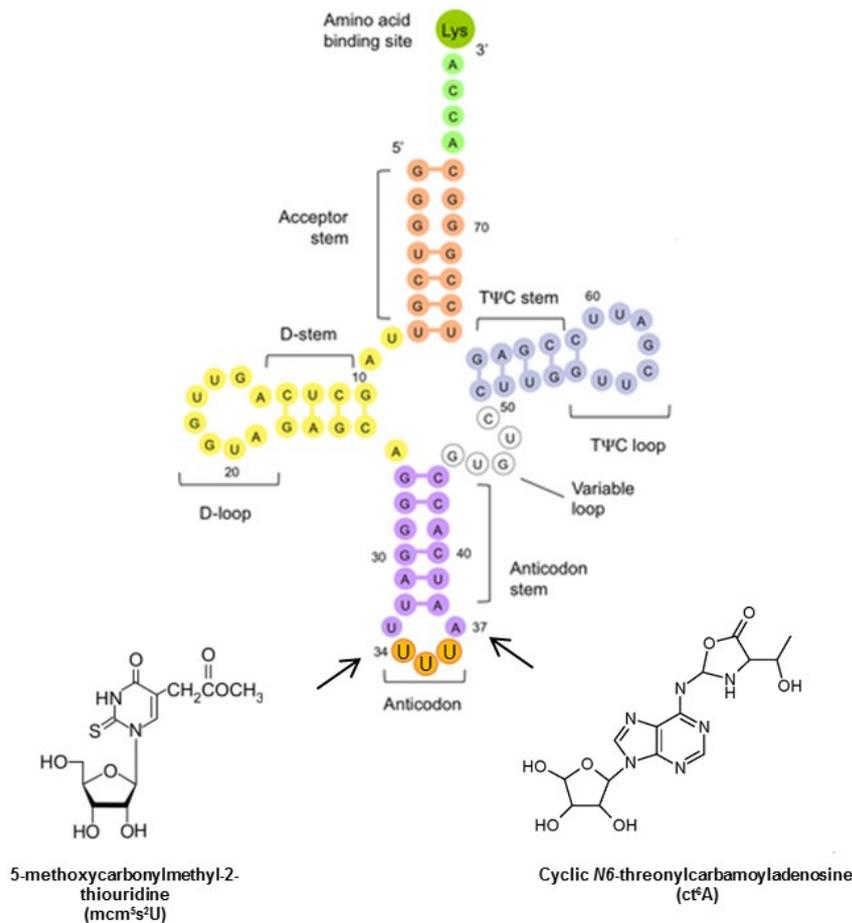


Abbildung 3 Schematischer Aufbau der modifizierten tRNA^{Lys}_{UUU}. Die kleblattförmige Sekundärstruktur unterteilt die tRNA in eine D (Dihydrouridin)-, TΨC (Pseudouridin)- und eine Anticodonschleife; zusätzlich kann eine Schleife variabler Größe auftreten. Der Akzeptorarm wird mittels einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit der Aminosäure (hier Lysin) beladen. Die dargestellte tRNA^{Lys}-Variante (Isoakzeptor) trägt ein UUU-Codon, dessen Nucleotid 34 (5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin, mcm⁵s²U) und das angrenzende Nucleotid 37 (Zyklisches N6-Threonylcarbamoyladenin, ct⁶A) stark modifiziert wurden. Die Abbildung wurde modifiziert nach [114].

tRNA-Modifikationen können auch direkt Informationen über den metabolischen Zustand der Zelle geben. So fungieren schwefelhaltige Uridinmodifikationen (mcm⁵s²U) als intrazelluläre physiologische Schwefelindikatoren, denn der Großteil der Schwefelatome einer Hefezelle ist in Form von modifizierten tRNA-Molekülen gebunden. Ein Mangel an den Schwefelquellen S-Adenosylmethionin und Cystein führt zu hypomodifizierten tRNAs, wodurch global die Translationsgeschwindigkeit reduziert wird. Diese Regulationsschleife ermöglicht es der Zelle unter Nährstoffmangel den Aminosäureverbrauch und die Zellteilungsrate anzupassen und den Energie- und Ressourcenverbrauch zugunsten des Überlebens zu drosseln [115].

Die Häufigkeit an tRNA-Modifikationen an Position 37, in der direkten 3'-seitigen Nachbarschaft zum Anticodon, ist zweifach höher als an der Wobble-Position [110]. Derivate der hier vorliegenden N6-Threonylcarbamoyladenin (t⁶A₃₇)-Modifikation sind in allen drei Domänen des Lebens konserviert. Es wurde gezeigt, dass t⁶A ein Hydrolyseprodukt des zyklischen ct⁶A ist, welches die eigentliche native Modifikation in Bakterien und Pilzen darstellt [5]. Die Bildung von (c)t⁶A umfasst einen

Einleitung

dreistufigen Syntheseprozess: die Substrate Threonin und Bicarbonat werden mit einem AMP-Rest gekoppelt (Threonyl-Carbamoyl-AMP) und dadurch energetisch aktiviert. Der KEOPS-Enzymkomplex überträgt das Zwischenprodukt auf die freie Aminogruppe von Adenosinmolekülen an der tRNA-Position 37 [116]. Während in höheren Eukaryoten die Synthese hier beendet ist, erfolgt in Hefen der Ringschluss zu ct^6A über eine Esterbildung unter ATP-Hydrolyse. In *Saccharomyces cerevisiae* wird der finale Schritt durch die Paralogen Tcd1/Tcd2 katalysiert [5]. Das ct^6A -Edukt wurde zunächst als ein zyklisch aktiver Ester mit einem Oxazolring beschrieben, jedoch zeigen neue Studien, dass ct^6A wahrscheinlich eher eine Hydantoin-Isoform einnimmt [117]. Die räumliche Sperrigkeit der (c) t^6A -Modifikationen zwingt das Anticodon in eine planare Ausrichtungsebene, wodurch die Affinität und die Präzision zur Codon-Bindung und schließlich die Translationsgenauigkeit enorm verbessert werden.

Defekte in der t^6A -Bildung führen deshalb zu weitreichenden Wachstumsdefekten in *S. cerevisiae* [6] und zu starken Entwicklungsverzögerungen in *Drosophila* [111]. In vielen humanpathogenen Bakterien, einschließlich *Vibrio cholerae*, *Mycoplasma* spp, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella* Typhi, ist der Knockout des t^6A -Syntheseweges letal, und Komponenten des KEOPS-Komplexes werden als Zielstrukturen neuartiger Antibiotika diskutiert [118, 119]. Die Rolle von tRNA-Modifikationen während der Pathogenese durch eukaryotische Krankheitserreger war dagegen zu Beginn der vorliegenden Arbeit vollkommen unbekannt.

Mit dem Abschluss der Translation unterlaufen Proteine zuletzt Reifungs- und Modifikationsprozesse. Diese dienen der akkuraten Faltung, und sie steuern über spezifische Signal- und Leader-Sequenzen die Lokalisation innerhalb der Zellkompartimente oder die Proteinseznierung über den sekretorischen Weg. Weiterführende Proteinmodifikationen beeinflussen zudem eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie das generelle Zellwachstum, Teilungsprozesse und Anpassungen an sich verändernde Umweltbedingungen. Ein Beispiel ist die Aktivierung von Kinasen durch Phosphorylierungen, wie die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Hog1 und die MAPK-Kinase (MAPKK) Pbs2. Letztere Faktoren tragen durch die Einleitung von Stressantworten und morphologischer Transitionen stark zur Virulenz von *C. albicans* bei [120-122].

Die Verknüpfungen von funktionellen Gruppen reguliert nicht nur die enzymatische Aktivität, auch strukturelle biochemische Eigenschaften von Proteinen können optimiert werden. Für die Adhärenz und die Pathogen-Wirts-Interaktionen sind oft reich glykosylierte Mannoproteine der pilzlichen Zellwand verantwortlich [123]. Diese Glykolysierungen entstehen in einem mehrstufigen Reifungsprozess im endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat und ihr Verlust führt zu einer reduzierten Zellwandintegrität und einer verminderten Virulenz bei *C. albicans* [124].

Neben der zielgerichteten Proteinbiosynthese tragen auch gesteuerte Proteindegradierungsprozesse wie Ubiquitinierung und Sumoylierung entscheidend zur Stressadaptation und Morphogenese bei. So führt der Verlust des Ubiquitinproteins Ubi4 in *C. albicans* zu mannigfaltigen Phänotypen von hyperfilamentösem Wachstum bis zu einem Verlust der Vitalität unter Mangelbedingungen und einen deutlich milderem Infektionsverlauf in einem Mausmodell der systemischen Candidiasis [125].

Als epigenetische Schnittstelle zwischen posttranslationellen und prätranskriptionellen Prozessen kann der Vorgang von Chromatinstrukturierungen eingeordnet werden. Chromatin ist eine hochdynamische Struktur aus DNA- und Protein-Komplexen, die die Verpackungsstruktur eukaryotischer DNA darstellt und zudem den physikalischen Zugang zu der DNA-Matrize für Transkriptions-, Rekombinations- und Replikationsereignisse determiniert. Pathogenitätsmechanismen wie die Hefe-zu-Hyph-Transition werden über den Acetylierungsstatus von Histonen in räumlicher Nähe zu virulenzassoziierten Genen wie *EFG1* gesteuert [126]. Dabei wird, induziert durch einen Mangel an Nährstoffen, initial der Hyphenrepressor Nrg1 von Promotoren der cAMP-Signalwegkomponenten verdrängt und die Keimschlauchbildung setzt ein. Im zweiten Schritt werden eine stabile Hyphenelongation und deren Aufrechterhaltung über Umstrukturierung des Chromatins ermöglicht. Dazu wird die Hda1-Deacetylase an H4-Histonuntereinheiten rekrutiert, wodurch ein erneutes Binden von Nrg1 verhindert und die Transkription hyphenassoziiierter Gene ermöglicht wird [51].

3.3 Der nächste Verwandte: *C. dubliniensis*

Candida dubliniensis wurde 1995 von Sullivan *et al.* aus einem HIV-infizierten Patienten mit oraler Candidiasis isoliert und aufgrund von genomischen Unterschieden zu *C. albicans* erstmals als neue *Candida*-Spezies beschrieben [3]. Aufgrund der Erstidentifikation am Trinity College (Universität Dublin) wurde die neue *Candida*-Art *C. dubliniensis* genannt [3]. Durch die Entwicklung neuer Differenzierungsverfahren der beiden sehr ähnlichen *Candida*-Spezies konnte *C. dubliniensis* im Nachgang weltweit in Proben von Patienten mit vielfältigen Primärinfektionen nachgewiesen werden [127]. Die vorliegenden Grunderkrankungen umfassen unter anderem HIV-Infektionen, Neutropenie, *Diabetes mellitus* und Krebserkrankungen [127-130]. Die Krankheitsbilder einer *C. dubliniensis*-Infektion reichen dabei ähnlich wie bei *C. albicans* von einem häufigen oberflächlichen Befall der Mundschleimhäute bis zu Blutbahninfektionen, Endokarditis oder Meningitis [131-134]. Die Ähnlichkeit der Schwesterspezies setzt sich auf genetischer Ebene fort: Über 96% der *C. dubliniensis*-Gene sind mit ihrem *C. albicans*-Gegenpart zu mindestens 80% identisch [135]. Trotz dieser hohen genetischen Ähnlichkeit unterscheiden sich beide Spezies aber stark in ihrem Auftreten und ihrer jeweiligen klinischen Relevanz. Retrospektive bioinformatische Metaanalysen klinischer Isolate, die ursprünglich als *C. albicans* identifiziert wurden, ergaben eine Fehlidentifikation in 0,2–6,7% der Fälle [130], wobei das älteste bekannte Isolat aus dem Jahr 1957 stammte [136]. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit aktuellen epidemiologischen Studien, die *C. dubliniensis* in 0,01–3,8% der Fälle mit systemischen *Candida*-Infektionen nachweisen konnten [19, 132, 137, 138]. Im Vergleich dazu war *C. albicans* mit bis zu 64% die am häufigsten isolierte *Candida*-Spezies [138]. Interessanterweise ist die Populationsstruktur von *C. albicans*-Isolaten deutlich divergenter als die von *C. dubliniensis*. Dadurch gilt *C. dubliniensis* als genomisch unflexibler und eingeschränkt in der Adaptationsfähigkeit, wodurch sich in Teilen das geringere Vorkommen und die verminderte Pathogenität des letzteren begründen ließen [139].

3.3.1 Phänotypischer Vergleich von *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Die intrinsischen Resistenzen von *Candida*-Arten gegenüber Antimykotika unterscheiden sich sehr stark. *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Isolate weisen normalerweise ein ähnliches Resistenzspektrum auf, wenn auch auf niedrigem Niveau. Trotzdem sind *C. dubliniensis*-Isolate aus AIDS-Patienten vermehrt fluconazolresistent [131], weshalb für die Behandlung eine präzise Speziesdifferenzierung notwendig ist. Neuere Techniken nutzen Raman-Spektroskopie zur Speziesidentifizierung [140], jedoch ist diese Methode technisch anspruchsvoll und kostenintensiv. In der klinischen Routine-Diagnostik nutzt man metabolische und morphologische Parameter zur Differenzierung von *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Kommerzielle Testkits wie Vitek2 oder API 20C basieren unter anderem auf der artspezifischen Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen und der Aktivität diverser Oxidasen und Aminopeptidasen [141]. Hinsichtlich der Kohlenhydratassimilation ist die Verwertung von Xylose und α -Methyl-D-Glucosid spezifisch für *C. albicans* [142]. Des Weiteren unterscheidet sich *C. dubliniensis* durch eine höhere Sensitivität gegenüber mannigfaltigen Stressoren, wie erhöhter Temperaturen ab 42 °C, sowie osmotischer und oxidativer Substanzen [142-145]. Eine Übersicht einzelner Stressoren ist in Tabelle 1 dargestellt. Sowohl die Verwertung alternativer Kohlenhydratquellen als auch die Toleranz gegenüber oxidativen Reagenzien und erhöhter Temperatur spielen eine Rolle während des Infektionsprozesses [34], so dass das spezifische Resistenzmuster auch die verminderte Virulenz von *C. dubliniensis* widerspiegelt [143].

Die bedeutendsten Unterschiede treten in der Morphogenese auf. Während bei *C. albicans* oftmals bereits ein einzelner induzierender Faktor die Hyphenbildung auslösen kann, bildet *C. dubliniensis* weniger häufig echte Hyphen und es bedarf einer Kombination mehrerer auslösender Reize [143]. Besonders gut ist der Effekt von nährstoffreichen Medien untersucht worden. Das Vorhandensein von 10% Serum in Vollmedium ist ausreichend, um eine vollständige Hyphenbildung bei *C. albicans* zu ermöglichen, während *C. dubliniensis* zusätzlich noch eine drastische Reduktion von Pepton und Glucose benötigt [65]. Eine geringe Filamentierung von *C. dubliniensis* wurde auch *ex vivo* und *in vivo* beschrieben [66, 146], und sie gilt als eine der wichtigsten Ursachen für die verminderte Virulenz im Tiermodell und im Patienten [143].

Neben der Filamentierung dient die Chlamydosporenbildung auf Differenzierungsmedien der diagnostischen Identifizierung. Da die untersuchten Arten die einzigen Chlamydosporen-positiven Vertreter der *Candida*-Gattung darstellen, können zur Abgrenzung von anderen *Candida* spp. auf stärkereichen Mais- und Reisagarmedien sowohl von *C. albicans* als auch von *C. dubliniensis* Chlamydosporen induziert werden [60, 145]. Medien auf Basis ölhaltiger Samen von Kreuzblütlern, Tabakpflanzen oder caseinhaltigem Milchpulver erlauben die spezifische Chlamydosporulation von *C. dubliniensis* [147-150]. Als molekularbiologische Ursache wird eine unterschiedliche Regulation des Hyphen- und Sporenrepressores Nrg1 diskutiert, da eine Nrg1-Deletion in *C. albicans* den hypersporulativen Phänotypen von *C. dubliniensis* phänokopiert [62, 151].

Tabelle 1 Ausgewählte artspezifische Phänotypen bei *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Die Tabelle wurde nach [143] erweitert. Die Symbole beschreiben die Wachstumseffizienzen der Hefestämme mit ++ sehr gut, + mäßig bis – kein Wachstum.

Wachstumsbedingungen		<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Wachstumstemperatur [152]	37 °C	++	++
	42 °C	++	-
	45 °C	+	-
Osmotischer Stress [152]	1,1 M NaCl	+	-
	0,4 M LiCl	+	-
Oxidativer Stress [153]	5 mM H ₂ O ₂	+	-
	80 µM Menadion	+	-
Verwertung von Kohlenhydraten [142]	Xylose	+	-
	Laktat	+	-
	α-Methyl-D-Glucosid	+	-
Filamentierung bei 37 °C [65, 146, 154]	Kochblutagar	++	-
	YPD + Serum	++	-
	H ₂ O + Serum	++	+
Chlamydosporenbildung bei 25-30 °C [148, 155]	Staib-Agar	-	++
	SLAD-Agar	-	++
	Maismehl- und Reisagar	+	++
Infektionsmodelle	Rekonstituierte humane Epithelien [146]	Hohe Invasion und Zellschädigung	Geringe Invasion und Zellschädigung
	Embryonierte Hühnereier [156]	Hohe Mortalität	Geringe bis mittlere Mortalität
	Systemische Mausinfektion [66]	Hohe Mortalität	Geringe bis mittlere Mortalität

3.3.2 Genetischer Vergleich von *C. albicans* und *C. dubliniensis*

C. dubliniensis ist die genetisch am nächsten verwandte sequenzierte Schwesternart von *C. albicans*, und die orthologen Gene zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit und syntenische Colinearität. Vergleichende Genomanalysen ergaben 29 *C. dubliniensis*- und 168 *C. albicans*-spezifische Gene [135]. Bislang lag der Fokus der Forschung auf den *C. albicans*-eigenen Genen, da diese potenziell mit der höheren Virulenz verknüpft sein können [143] (Übersicht in

Tabelle 2). Bei dieser Hefe sind bereits 26,6% der Gene charakterisiert worden. Im Vergleich dazu ist in *C. dubliniensis* das Potential, noch unbekannte Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren, sehr hoch, da im Moment nur 15 Gene (0,26% des Genoms) als verifiziert gelten (<http://www.candidagenome.org/> Stand Juni 2017). Viele der *C. albicans*-spezifischen Genen kodieren für hyphen- und virulenzassoziierte Proteine. In *C. dubliniensis* fehlen dagegen wichtige hyphenassoziierte Faktoren wie Als3, ein zellwandständiges Protein, welches durch seinen Agglutinin-ähnlichen Charakter Adhärenz an und Invasion in Wirtszellen ermöglicht [157]. Ein weiteres wichtiges GPI-gekoppeltes Adhäsion mit großer Bedeutung für die Biofilmbildung auf mukosalen Oberflächen ist Hwp1 [158], dessen Ortholog in *C. dubliniensis* signifikante Sequenzunterschiede aufweist [135]. Hyr1 ist ein weiteres GPI-verankertes Hyphenprotein, welches spezifisch für *C. albicans* ist. Eine hohe *HYRI*-Expression geht einerseits mit einer höheren Überlebensrate von *C. albicans*-Zellen nach Coinkubation mit Neutrophilen oder Makrophagen einher, und andererseits korreliert das *HYRI*-Transkriptlevel mit dem Maß der Schädigung von Leber und Milz in Mausinfektionen [159].

Unterschiede gibt es zudem in der Zusammensetzung von Genfamilien. Diese Familien umfassen Gene mit stark übereinstimmenden Sequenzen, die Ergebnisse evolutionärer Genduplikationen sind. Ihre Genprodukte können funktional überlappen oder sich spezialisieren und in verschiedenen Nischen von Bedeutung sein. In *C. albicans* haben sich durch evolutionäre Adaptationsprozesse Genfamilien von virulenzassoziierten Faktoren erweitert, während *C. dubliniensis* mehr Genverluste und Geninaktivierungen (Pseudogenisierung) erlitt. Diese reduktive Evolution von *C. dubliniensis* ist wohl maßgeblich für die geringere Pathogenität [160]. Die Genfamilie der sekretorischen Aspartylproteasen (*SAP*-Gene) beispielsweise besteht im Genom von *C. albicans* aus zehn Genen und dient der Nährstoffaufnahme und dem Adhäsion-Invasions-Prozess [161]. Statt den einzelnen Genen *SAP4/5/6* besitzt *C. dubliniensis* nur ein einzelnes Hybridgen [135]. Quantitativ treten die größten Unterschiede bei den telomerassoziierten Genen (*TLO*-Gene) auf. Während in *C. albicans* seit der Spaltung von der Linie zu *C. dubliniensis* vor 20 Millionen Jahren die Genfamilie auf 14 Mitglieder expandierte [160], trägt *C. dubliniensis* nur zwei *TLO*-Gene [162]. Interessanterweise interagieren *TLO*-Proteine mit dem Mediator-Transkriptionskomplex, und eine *TLO*-Überexpression in *C. dubliniensis* führt zu einem *C. albicans*-ähnlichen Filamentierungsverhalten [162]. Aufgrund der Expansion von *TLO*-Genen in *C. albicans* ist es möglich, dass nischenabhängig unterschiedliche *TLO*-Faktoren an den Mediatorkomplex binden und so auf cotranskriptioneller Ebene das Transkriptom beeinflussen. Dieser Mechanismus einer größeren Plastizität könnte dem Pilz so eine rasche Adaptation an variierende Umweltbedingungen ermöglichen [162, 163]. Weitere Genfamilien mit artspezifischen Unterschieden sind die Filamentwachstumsfaktoren (*FGR*-Gene) und Zinkcluster-Transkriptionsfaktoren (*ZCF*-Gene), die häufig in *C. dubliniensis* abwesend sind oder nur als Pseudogene vorliegen [135, 164]. Neben den genomischen Unterschieden werden vorhandene Orthologe besonders von morphologieassoziierten Genen oft differentiell exprimiert. Beispiele sind die hyphenassoziierten Gene *UME6* und *SFL2*, der morphogenetische Repressor *Nrg1* und das Polyprotein *Ece1*, das Vorläuferprotein für das Peptidtoxin Candidalysin [62, 65, 66, 144, 165].

Tabelle 2 Ausgewählte artspezifische Gene und Genfamilien bei *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Die Tabelle wurde nach [62, 66, 135, 143, 166] verändert und erweitert.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Anzahl artspezifischer Gene	168	29
<i>ALS3</i> (Adhäsion, Invasin)	Vorhanden	Abwesend
<i>HYR1</i> (hyphenassoziiertes Zellwandprotein)	Vorhanden	Abwesend
<i>HWP1</i> (hyphenspezifisches Adhäsion)	Vorhanden	Divergent in der DNA-Sequenz
<i>NRG1</i> (morphologischer Repressor)	Repressor der spezifischen Chlamdosporenbildung	Repressor der spezifischen Hyphenbildung
<i>SAP4, 5, 6</i> (sekretorische Aspartylproteasen)	Drei	Ein Hybridgen
<i>TLO</i> -Gene (telomernahe Gene)	14 Gene	Zwei Gene
<i>ZCF</i> -Gene (Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren)	36 Gene	34 Gene (<i>ZCF6</i> und <i>ZCF28</i> fehlen)

3.3.3 Wege zur Identifizierung von pathogenitätsassoziierten Faktoren

Die Methoden der Genidentifikation in der postgenomischen Ära sind vielfältig. Durch vergleichende Genomanalysen werden konservierte hypothetische Gene und funktionelle Proteindomänen identifiziert, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die gleichen Funktionen in verschiedenen Organismen erfüllen. Auch die Suche nach pathogenitätsdeterminierenden Genen nutzt häufig bioinformatischen Methoden, die ferner eine Analyse von sequenzierten, aber genetisch nicht manipulierbaren Mikroorganismen, wie *Chlamydia*-Arten, ermöglicht [167]. Diese Virulenzfaktoren werden per Definition in *in vivo*-Situationen zu Beginn oder während einer Infektion exprimiert und ein Screening von Mutagenesebanken unter infektionssimulierenden Bedingungen dient der Genidentifikation. Vergleichende Expressionsuntersuchungen per Microarray oder RNA-Sequenzierung von *in vitro*- und *ex vivo*-Kulturen bzw. infektiösem Gewebe erlauben die Beschreibung der infektionsspezifischen transkriptionellen Antwort [168, 169]. So ergab die Analyse differentiell regulierter Gene bei Mausinfektionen eine physiologische Anpassung des Pilzes an die befallenen Nieren und die starke Expression von Virulenzfaktorengenen wie *EFG1* oder *CSRI* [169-171].

Ein anderer Ansatz nutzt den genetischen Vergleich verwandter Mikroorganismen mit unterschiedlichen Virulenzanlagen. Klinische Isolate einer pathogenen Spezies oder engverwandter Arten unterscheiden sich häufig in ihrer Virulenz. Beispielsweise umfasst die Gattung *Salmonella* über 2200 Serovare, die sich in ihrer Wirtsanpassung und im Krankheitsverlauf unterscheiden [172].

Auch bei den genetisch eng verwandten Arten *C. albicans* und *C. dubliniensis* konnten durch die differentielle Pathogenität und damit verbundenen Phänotypen Gene identifiziert werden: mit dem

Ziel genetische Faktoren zu charakterisieren, die für die arttypischen Merkmale verantwortlich sind, wurden genomische DNA-Fragmente von *C. albicans* in einen *C. dubliniensis*-Rezipientenstamm chromosomal integriert [62]. Das Screening dieser genetischen Bibliothek unter ausgewählten Bedingungen ermöglicht dabei die Selektion von *C. dubliniensis*-Transformanten, die *C. albicans* phänokopieren. Eine Analyse der übertragenen genetischen Information konnte dann neuartige morphologische oder stressassoziierte Gene identifizieren. Im Zuge eines solchen Screenings wurde von Staib und Morschhäuser Nrg1 als *C. albicans*-spezifischer Chlamydosporenrepressor erkannt [62]. Die vorliegende Arbeit nutzt in einem ähnlichen Ansatz sowohl bioinformatische als auch vergleichende gentechnische Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung bisher uncharakterisierter *Candida*-Gene.

3.4 Ziele der Arbeit

Die beiden humanpathogenen und genetisch eng verwandten *Candida*-Arten *C. albicans* und *C. dubliniensis* unterscheiden sich in ihrer klinischen Relevanz, vermutlich auf Grund artspezifischer Unterschiede in Stressresistenz und morphologischer Plastizität [130, 132, 145, 173]. Durch vergleichende Analysen sollten im Rahmen dieser Arbeit Faktoren identifiziert werden, die zu diesen spezifischen Phänotypen beitragen und somit eine Rolle in der Infektionsbiologie von *Candida* spp. spielen.

Zelluläre Antworten auf verfügbare Nährstoffe sind vielfältig und steuern beispielsweise die Expression wichtiger Virulenzfaktoren und damit assoziierte nährstoffabhängige Signalwege bedingen artspezifische Eigenschaften von *Candida*-Arten [4, 63, 65, 174, 175]. In einem ersten methodischen Ansatz sollte ein zufallsbasierter, gegenseitiger Genaustausch einen phänotypischen Transfer der Hungermorphotypen erlauben [62]. Eine Evaluierung der übertragenen Genfragmente sollte neuartige Faktoren der Mangelantwort, sowie putative Pathogenitätsmechanismen aufdecken und ihre biologische Rolle besser definieren.

Nach der Aufspaltung der beiden *Candida*-Arten kam es vermutlich zu einer reduktiven Evolution von *C. dubliniensis* und einer Erweiterung des Repertoires an virulenzassoziierten Faktoren von *C. albicans* [135, 143, 165]. In einem zweiten Ansatz sollten in dieser Arbeit über *in silico*-Analysen artspezifische Gene prognostiziert werden. Diese sollten durch Gendeletion bzw. einer künstlichen Genexpression charakterisiert werden. Die Phänotypisierung sollte im Besonderen die *C. albicans*-intrinsischen Merkmale [34], wie Stresstoleranz, Filamentierungskapazität und die Virulenz im Zellkultur- und Tiermodell, validieren. Neben der artspezifischen Abundanz einzelner Gene kam es zur evolutionären Neuerschaltungen von Signalwegen. Am Beispiel des gemeinsamen Transkriptionsfaktors Csr1 sollte eine systematische Analyse, sowohl evolutionär konservierte Funktionen als auch artspezifische Regulationsmechanismen, identifizieren.

C. albicans und *C. dubliniensis* sind polymorphe Hefen, die sich von anderen Vertretern der Gattung insbesondere durch ihre ausgeprägte Hyphen- und Chlamydosporenbildung unterscheiden. Die biologische Funktion der stark ummantelten Sporen ist in *Candida* spp. bisher unbekannt und grundlegende Fragen zur möglichen Funktion sollten in dieser Arbeit beantwortet werden. Welche äußeren Bedingungen induzieren oder reprimieren zum Beispiel den morphologischen Wechsel?

Welchen Einfluss haben bekannte Schlüsselfaktoren der Filamentierung während der Chlamydosporulation, im Speziellen welche Überlappungen sowie regulativen Unterschiede treten auf? Wie unterscheidet sich das Transkriptom von hefe- gegenüber chlamdosporenhaltigen Kulturen? Ein zusammenfassendes Bild zentraler Signalkomponenten und deren Zusammenspiel sollte in einem ersten Modell zur Regulation der Chlamydosporenbildung von *Candida*-Arten dargestellt werden.

4 Publikationen dieser Arbeit

4.1 Manuskript 1: Die Funktion von Csr1 in *C. dubliniensis*

„Csr1/Zap1 Maintains Zinc Homeostasis and Influences Virulence in *Candida dubliniensis* but Is Not Coupled to Morphogenesis“ [156]

Bettina Böttcher, Katja Palige, Ilse D. Jacobsen, Bernhard Hube, Sascha Brunke

Veröffentlichtes Manuskript (online seit 22.05.2015):

Eukaryotic Cell. July 2015 14:661–670. doi:10.1128/EC.00078-15.

Inhaltsangabe

Das Aufrechterhalten physiologischer intrazellulärer Metallkonzentrationen ist eine wichtige Voraussetzung für pathogene Mikroorganismen zur erfolgreichen Besiedlung des Wirts. In dieser Studie wird gezeigt, dass in dem fakultativen Pathogen *Candida dubliniensis* die intrazelluläre Zinkhomöostase unter Mangelbedingungen durch den Transkriptionsfaktor Csr1 vermittelt wird. Wie bei anderen Pilzen (bspw. *C. albicans*) induziert dieser Aktivator die Transkription der Zinkimportergene *ZRT1* und *ZRT2*, des vakulären Zinkexportergens *ZRT3* und des Gens *PRA1*, welches für ein sekretorisches zinkbindendes Protein kodiert. Die Deletion des Csr1-Regulators in einer *C. dubliniensis csr1Δ/Δ*-Mutante führte zu einem Wachstumsdefekt unter Zinkmangel, welcher durch eine gezielte Überexpression nur von *ZRT2* weitestgehend wieder behoben werden konnte. Anders als *C. albicans* zeigte die *C. dubliniensis csr1Δ/Δ*-Mutante aber keine morphologischen Defekte, jedoch war ihre Virulenz in embryonierten Hühnereiern als Infektionsmodell attenuiert. Damit konnte sowohl die wichtige Rolle der Zinkhomöostase in der Pathogenese von Pilzinfektionen bestätigt werden, als auch ein evolutionärer Unterschied in den Transkriptionsnetzwerken dieser beiden eng verwandten Spezies gezeigt werden, der zu den Unterschieden in Morphologie und Virulenz beitragen könnte.

Eigenanteil

Bettina Böttcher hat die zentralen Fragestellungen erarbeitet und den größten Teil der Experimente geplant und – mit Ausnahme der Gendeletionen und der Infektionsexperimente – selbst durchgeführt. Sie hat die Daten ausgewertet und die entsprechenden Hypothesen und Schlussfolgerungen formuliert. Darüber hinaus hat sie das Manuskript zum größten Teil geschrieben und die Abbildungen erstellt.

Geschätzter prozentualer Anteil der Autoren

Bettina Böttcher	60%	Katja Palige	15%
Ilse D. Jacobsen	8%	Bernhard Hube	5%
Sascha Brunke	12%		

Bernhard Hube



Csr1/Zap1 Maintains Zinc Homeostasis and Influences Virulence in *Candida dubliniensis* but Is Not Coupled to Morphogenesis

Bettina Böttcher,^a Katja Palige,^b Ilse D. Jacobsen,^{c,d} Bernhard Hube,^{a,e} Sascha Brunke^{a,e}

Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute Jena, Jena, Germany^a; Microfluidic ChipShop GmbH, Jena, Germany^b; Friedrich Schiller University, Jena, Germany^c; Research Group Microbial Immunology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute Jena, Jena, Germany^d; Center for Sepsis Control and Care, Jena, Germany^e

The supply and intracellular homeostasis of trace metals are essential for every living organism. Therefore, the struggle for micronutrients between a pathogen and its host is an important determinant in the infection process. In this work, we focus on the acquisition of zinc by *Candida dubliniensis*, an emerging pathogen closely related to *Candida albicans*. We show that the transcription factor Csr1 is essential for *C. dubliniensis* to regulate zinc uptake mechanisms under zinc limitation: it governs the expression of the zinc transporter genes *ZRT1*, *ZRT2*, and *ZRT3* and of the zincophore gene *PRA1*. Exclusively, artificial overexpression of *ZRT2* partially rescued the growth defect of a *csr1Δ/Δ* mutant in a zinc-restricted environment. Importantly, we found that, in contrast to what is seen in *C. albicans*, Csr1 (also called Zap1) is not a major regulator of dimorphism in *C. dubliniensis*. However, although a *csr1Δ/Δ* strain showed normal germ tube formation, we detected a clear attenuation in virulence using an embryonated chicken egg infection model. We conclude that, unlike in *C. albicans*, Csr1 seems to be a virulence factor of *C. dubliniensis* that is not coupled to filamentation but is strongly linked to zinc acquisition during pathogenesis.

Access to zinc is essential for organisms throughout the three domains of life. It is the only metal that occurs as a cofactor in all six classes of enzymes, from oxido-reductases to lyases (1), and the average proportion of enzymes containing zinc is 8.8% in eukaryotic proteomes (2). In pathogens, virulence-associated proteins frequently bind zinc for structural stability or catalytic activity; e.g., the Ser/Thr-protein kinase PrkC of *Bacillus anthracis*, which is essential for its pathogenicity, is regulated by zinc (3). In the pathogenic yeast *Candida albicans*, three out of six known superoxide dismutases (CaSod1, CaSod4, and CaSod6) are copper-zinc dependent. Enzymes of this class detoxify reactive oxygen species and thus contribute to virulence (4–6). Therefore, it is of particular importance for both benign and pathogenic microbes to ensure a sufficient zinc supply, especially when faced with a micronutrient-poor environment.

Exploiting this dependency, mammalian hosts manipulate levels of accessible zinc and other metals to inhibit pathogen growth and dissemination. This targeted limitation of micronutrients is known as nutritional immunity and is one of the main strategies used to defend against pathogenic microorganisms (7). To oppose zinc deprivation, pathogenic bacteria and fungi evolved specialized uptake mechanisms to obtain zinc (8, 9). For example, a high-affinity zinc transporter system is required for virulence of *Salmonella enterica* in mice (10). The intracellular zinc homeostasis is generally strictly controlled, and in *C. albicans*, the response to zinc deficiency is mediated by the transcription factor Csr1 (*Candida* suppressor of *ROK1*) (11), the ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* Zap1 (zinc-responsive activator protein). Within the *Candida* clade, *CSR1* orthologs have been found in all sequenced species. However, to date, this transcriptional factor has been investigated only in *C. albicans* in more detail, while the function of Csr1 in other pathogenic yeasts like *Candida glabrata* or even in the closest relative of *C. albicans*, *Candida dubliniensis*, is unknown.

Both *C. dubliniensis* and *C. albicans* are harmless gastrointestinal colonizers, but they can cause diseases ranging from superficial

mucosal infections to life-threatening candidemia, especially in immunocompromised individuals. Interestingly, *C. dubliniensis* is less frequently isolated from patients with nosocomial bloodstream infections than *C. albicans* (2 to 3% versus 10%, respectively) (12–14). The overall lower virulence of *C. dubliniensis* has also been confirmed in mice infection models (15) and was found to be associated with differences in species-specific pathogenicity properties, such as the ability to adhere and to form true hyphae, which allow tissue invasion (16, 17). Finding differences in the genetic setup and infection-relevant phenotypes of these two fungi is, therefore, a promising avenue to dissect virulence in pathogenic yeasts and may provide insights into the mechanisms of evolutionary rewiring of regulatory factors among related microbes.

In *C. albicans*, Csr1 is known to have dual functions: it plays the key role both in transcriptional regulation of zinc homeostasis and in biofilm formation. *C. albicans* mutants lacking *CSR1* hence cannot proliferate under low-zinc conditions and show reduced filamentation in the presence of serum (11) accompanied by al-

Received 5 May 2015 Accepted 9 May 2015

Accepted manuscript posted online 22 May 2015

Citation Böttcher B, Palige K, Jacobsen ID, Hube B, Brunke S. 2015. Csr1/Zap1 maintains zinc homeostasis and influences virulence in *Candida dubliniensis* but is not coupled to morphogenesis. *Eukaryot Cell* 14:661–670. doi:10.1128/EC.00078-15.

Address correspondence to Sascha Brunke, sascha.brunke@leibniz-hki.de.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00078-15>.

Copyright © 2015, Böttcher et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial-ShareAlike 3.0 Unported license, which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

doi:10.1128/EC.00078-15

Böttcher et al.

TABLE 1 Strains in this study

<i>Candida</i> strain	Parent	Genotype ^a	Reference
SC5314		<i>C. albicans</i> wild-type strain	59
Wü284		<i>C. dubliniensis</i> wild-type strain	60
CSR1/SAT1A/B	Wü284	CD36_44490Δ::SAT1-FLIP/CD36_44490	This study
CSR1/csr1ΔA/B	CdCSR1M1A/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490	This study
csr1Δ/SAT1A/B	CdCSR1M2A/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::SAT1-FLIP	This study
csr1Δ/ΔA/B	CdCSR1M3A/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::FRT	This study
CdCSR1KS1A/B	csr1Δ/ΔA/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::CD36_44490-T _{ACT1} -SAT1-FLIP	This study
csr1Δ/Δ+CSR1A/B	CdCSR1KS1A/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::CD36_44490-T _{ACT1} -FLIP	This study
ZRT1 ^{OE} A/B	Wü284	ADH1/adh1::P _{ADH1} -CD36_46440-caSAT1	This study
ZRT2 ^{OE} A/B	Wü284	ADH1/adh1::P _{ADH1} -CD36_17380-caSAT1	This study
PRA1 ^{OE} A/B	Wü284	ADH1/adh1::P _{ADH1} -CD36_46450-caSAT1	This study
csr1Δ/Δ+ZRT1 ^{OE} A/B	csr1Δ/ΔA/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::FRT ADH1/adh1::P _{ADH1} -CD36_46440-caSAT1	This study
csr1Δ/Δ+ZRT2 ^{OE} A/B	csr1Δ/ΔA/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::FRT ADH1/adh1::P _{ADH1} -CD36_17380-caSAT1	This study
csr1Δ/Δ+PRA1 ^{OE} A/B	csr1Δ/ΔA/B	CD36_44490Δ::FRT/CD36_44490Δ::FRT ADH1/adh1::P _{ADH1} -CD36_46450-caSAT1	This study

^a SAT1-FLIP denotes the SAT1 flipper cassette (33).

tered biofilm formation (18). Further analysis of genes regulated by Csr1 of *C. albicans* (CaCsr1) under biofilm-inducing conditions revealed 60 targets, including CaZRT1-3, CaPRA1, and CaCSR1 itself (18). It is noteworthy that in biofilm-producing communities, a *C. albicans* *csr1Δ/Δ* mutant strain secretes smaller amounts of the quorum-sensing molecule farnesol, which contributes to an altered morphology (19).

The Zrt proteins belong to the ZIP (Zrt/Irt-like proteins) transporter family and facilitate zinc ion transfer across membranes into the cytosol or cellular organelles. Zrt1 of *S. cerevisiae* (ScZrt1) is a high-affinity transporter in *S. cerevisiae* that mediates zinc uptake under strong zinc depletion, but it is downregulated under low-zinc conditions. There, the low-affinity zinc transporter ScZrt2 ensures import of zinc (20, 21). These complementary uptake systems are under the control of ScZap1 (22). Tightly controlled zinc uptake mechanisms in response to extracellular zinc levels have been observed not only in *S. cerevisiae* but also in *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus fumigatus* (22–24). Finally, Pra1 is a zinc-binding protein which is part of a novel zinc uptake mechanism of *C. albicans* recently discovered by Citiulo et al. (25).

A *C. albicans* *csr1Δ/Δ* mutant is known to be proliferation defective during murine infections (26) and to elicit a decreased immune response in mice (27). In addition to this observation, expression of *CSR1* and some of its target genes was increased up to 10-fold during the early stage of infection with the corresponding *C. albicans* wild-type strain (27).

In the present work, we analyzed the role of the *C. dubliniensis* transcription factor Csr1 (CD36_44490)—a homolog of *C. albicans* Csr1—in zinc homeostasis, germ tube formation, and virulence traits.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions. *Candida* strains were routinely propagated on YPD agar (20 g peptone, 10 g yeast extract, 20 g glucose, 15 g agar per liter) at 30°C and stored as frozen stocks in YPD medium with 15% (vol/vol) glycerol at –80°C. For zinc starvation experiments, low-zinc medium (LZM) was prepared as described previously (22). The medium was supplemented with ZnSO₄ as indicated (LZM0 contains no zinc; LZM25 and LZM2000 contain 25 μM and 2,000 μM ZnSO₄, respectively), and 25 μM FeSO₄ was used as a source of iron. *Candida* strains used in this work are listed in Table 1.

Germ tube assays. Strains were grown in YPD overnight (30°C and 180 rpm), washed with double-distilled water (ddH₂O), and transferred into filament-inducing medium at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.2. To stimulate filamentation, we used spider medium (1% mannitol, 1% nutrient broth, 0.2% K₂HPO₄ [pH 7.2]), liquid YPD, or H₂O plus 10% (vol/vol) fetal calf serum. Cultures were shaken (180 rpm) for 4 h at 37°C, and morphology was microscopically analyzed (Axiovert, Zeiss, Germany).

Chlamyospore formation. Chlamyospore production was induced on rice extract-Tween 80 agar (BD, Heidelberg, Germany) or Staib agar (28), both prepared as described before. The plates were incubated at 28°C for 2 to 4 days in the dark, and chlamyospore formation was monitored microscopically.

Plasmid construction. The deletion cassette for *CSR1* was constructed as follows. An Apal-XhoI fragment with *CSR1* upstream sequences was cloned after amplification by PCR with the primers CSR1-1 and CSR1-2 (see Table S1 in the supplemental material) using genomic DNA from *C. dubliniensis* Wü284 as the template. A SacII-SacI fragment containing *CSR1* downstream sequences was obtained with the primers CSR1-3 and CSR1-4. The *CSR1* upstream and downstream fragments replaced *SSU2* upstream and downstream fragments in plasmid pSSU2M2 (29) via the introduced restriction sites, to result in pCSR1M2, in which the *SAT1* flipper is flanked by *CSR1* sequences.

The whole *CSR1* gene for the gene reconstitution was amplified using the primers CdCSR1-1 and CdCSR1-5, the Apal/BglII-cut DNA fragment was integrated into pSAP2KS1 (30), and the *CSR1* downstream DNA element was inserted as described above.

For the generation of the *PRA1* overexpression cassette, a XhoI-BglII fragment was amplified via PCR with the primers PRA1-1 and PRA1-2. Genomic DNA from *C. dubliniensis* Wü284 was used as the template. This DNA fragment was introduced behind the *cdADH1* promoter into the pcdADH1E2 vector (31), and the plasmid was named pcdPRA1E1. The plasmids pcdZRT1E1 and pcdZRT2E1 were constructed in a similar way by amplifying a XhoI-BglII fragment with the primer pair ZRT1-1 and ZRT1-2 or ZRT2-1 and ZRT2-2. The primer ZRT2-1 carried a SalI restriction site that is compatible with the XhoI overhang of the parental plasmid pcdADH1E2.

***C. dubliniensis* transformant construction.** Linear DNA fragments were transformed by electroporation into chemically competent *C. dubliniensis* cells (32), and clones were selected on YPD plates containing nourseothricin (Werner Bioagents, Jena, Germany). The usage of the *SAT1* flipper strategy allowed the recycling of the selection marker, as described here (33). The insertion locus of the DNA fragment was confirmed by Southern blot analyses.

Southern blotting. A 10- μ g portion of isolated genomic DNA was digested with an appropriate restriction enzyme. After DNA separation on an agarose gel (1%), DNA was stained with ethidium bromide and transferred onto a nylon membrane using a vacuum blot system. UV-linked DNA was hybridized with chemiluminescence-labeled probes and detected via the Amersham ECL direct nucleic acid labeling and detection kit (GE Healthcare, Braunschweig, Germany) according to the manufacturer's instructions (see Fig. S1 in the supplemental material).

Growth curve analyses. Proliferation under zinc depletion was evaluated via growth curve assays. Strains were pregrown overnight in YPD at 30°C and after repeated washing, cells with an OD₆₀₀ of 0.4 were inoculated in LZM0 without additional zinc. After starvation in LZM0 for 24 h at 30°C, cells were diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 in LZM supplemented with various concentrations of ZnSO₄. Cultures were incubated at 30°C in a Magellan TECAN plate reader with shaking for 30 s, and the OD₆₀₀ was determined every 15 min over 48 h. Changes of the OD₆₀₀ were plotted against the incubation time.

Quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR). To determine gene expression rates, cells were precultured in YPD overnight (30°C and 180 rpm) and washed with phosphate-buffered saline (PBS). A total of 5×10^6 cells/ml were inoculated into 200 ml LZM plus 2,000 μ M ZnSO₄, and the cells were grown for an additional 24 h (30°C and 180 rpm). To remove residual zinc, cultures were washed four times with ultrapure water, and all yeast cells were transferred into 200 ml LZM0 without zinc.

Cells from 20 ml of liquid culture were sampled and frozen in liquid nitrogen at 0 h, 0.5 h, 4 h, and 24 h. RNA was isolated using an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. A Bioanalyzer instrument (Agilent, Santa Clara, CA) was used to measure RNA quality, and RNA concentration was determined via NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A 700-ng portion of RNA was treated with DNase and transcribed into cDNA (enzymes by Promega [Fitchburg, WI]). Finally, a total amount of 13.3 ng cDNA was used for each qRT-PCR that included EvaGreen as fluorescent dye and ROX as an internal reference (Biosell, Feucht, Germany). The experiments were performed in a thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) and run in biological duplicates and technical triplicates. The expression rates reported here are relative to the expression values of the housekeeping gene *TEF3*. All primers are listed in Table S1 in the supplemental material.

Sequence analyses. The protein sequences of *C. dubliniensis* Cd36_44490 (CdCsr1), *C. albicans* orf19.3794 (CaCsr1), *C. glabrata* CAGL0J05060g (CgCsr1), *S. cerevisiae* YJL056C (ScZap1), *Aspergillus fumigatus* Afu1g10080 (ZafA), and *Cryptococcus neoformans* (CnZap1) were compared using NCBI PBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); they were aligned with the ClustalW2 multiple-sequence-alignment tool (<http://simgene.com/ClustalW>), and the phylogenetic tree was constructed at <http://www.phylogeny.fr> (34). This phylogenetic analysis includes MUSCLE (v3.7) alignment, removal of ambiguous regions with Gblocks (v0.91b), and the reconstruction of the phylogenetic tree used the maximum-likelihood method implemented in the PhyML program (v3.0 aLRT). The tree was plotted with TreeDyn (v198.3).

Pro Coffee (35) was used as a tool to align homologous promoter regions of *ZRT2* from *C. dubliniensis*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae*.

Chicken embryo infection model. The embryonated chicken infection model was used to study virulence as described previously (36). Briefly, overnight cultures of yeasts were washed with PBS and adjusted to 10^8 cells/ml. An inoculum of 10^7 yeast cells/egg was applied to the chorio-allantoic membrane at developmental day 10 via an artificial air chamber. In each experiment, the viability of 20 eggs per group (*Candida* or PBS control) was evaluated daily by candling for 7 days. Experiments were performed twice. Surviving embryos were humanely terminated by chilling on ice at the end of the experiment. All experiments were performed in compliance with the German animal protection law. According to this, no specific approval is needed for work performed on avian embryos before

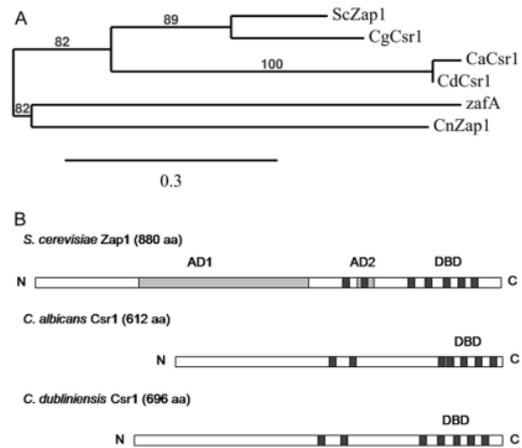


FIG 1 Structural analysis of the homologous Csr1/Zap1 protein sequences from distinct fungi: *Candida dubliniensis* Cd36_44490 (CdCsr1), *C. albicans* 19.3794 (CaCsr1), *C. glabrata* CAGL0J05060g (CgCsr1), *S. cerevisiae* YJL056C (ScZap1), *Cryptococcus neoformans* serotype A CNAG_05392 (CnZap1), and *Aspergillus fumigatus* Afu1g10080 (ZafA). Construction of the phylogenetic tree used the maximum likelihood method. The scale bar indicates the genetic distance, which is proportional to the number of amino acid substitutions. (B) Comparison of the Zap1/Csr1 protein domains. The protein structure was determined using the SMART analysis service. Zap1 from *S. cerevisiae* contained two activation domains (AD1 and AD2; in gray) that are absent in both *Candida* species. Seven C₂H₂-like zinc finger domains (black) were found in all analyzed species, and comparison of the C-terminal DNA binding domain (DBD) regions showed highest similarities.

the time of hatching. Experiments were terminated at the latest on developmental day 18.

RESULTS

The transcription factors CdCsr1, CaCsr1, and ScZap1 are orthologous proteins. Protein sequence comparisons using NCBI PBLAST revealed a high similarity of the *C. dubliniensis* protein Cd36_44490 with the *C. albicans* transcription factor and zinc acquisition regulator Csr1 (also known as Zap1; 86% identities and 91% positives), the *S. cerevisiae* zinc-responsive activator protein Zap1 (37%/52%), and the Zap1 ortholog CNAG_05392 in *Cryptococcus neoformans* serotype A (43%/51%). Multiple sequence alignments showed the highest similarities for the C-terminal part of the protein sequence with a high degree of conservation of this domain. Phylogenetic tree reconstruction using the protein sequences of Csr1 homologs from the yeasts *C. dubliniensis* (CdCsr1), *C. albicans* (CaCsr1), *C. glabrata* (CgCsr1), and *S. cerevisiae* (ScZap1), from the filamentous fungus *A. fumigatus* (ZafA), and from the basidiomycete *C. neoformans* (CnZap1) shows the relationship of the Csr1 proteins in fungi (Fig. 1A). The close relationship of *C. dubliniensis* and *C. albicans* is well reflected in this analysis.

The protein domain architecture of Csr1 in *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. dubliniensis* was then analyzed using the SMART program (34, 37). In all these homologs, the C-terminal region contains seven C₂H₂-like zinc finger domains (Fig. 1B). Both ac-

tivation domains (ADs) present in ScZap1, AD1 and AD2 (38), were not detected in *C. dubliniensis* or in *C. albicans*.

The characteristics of the *ZRT2* promoter region in *S. cerevisiae* allow both transcriptional activation and repression of *ZRT2* via Zap1 in response to zinc levels (39). An alignment of the homologous *ZRT2* promoter regions in *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. dubliniensis* using Pro Coffee (35) revealed a strong divergence of the zinc-responsive elements (ScZRE1 and ScZRE2) between the *Candida* species and *S. cerevisiae* (39). Of particular note, the repressive ScZRE3 region was entirely absent in *Candida* spp. (see Fig. S2 in the supplemental material). However, a direct comparison of *C. albicans* and *C. dubliniensis* promoter sequences revealed a high similarity between two species. This hints at a promoter type-specific, distinct regulation of the *ZRT2* genes among the different yeasts.

CSRI is essential for *C. dubliniensis* growth in low-zinc medium. The aim of this study was to elucidate the functions of the transcriptional factor CdcSR1, called CSRI here, in *C. dubliniensis*. To this end, we created both a *csr1*Δ/Δ knockout and a CSRI-complemented mutant. Additionally, the zinc responsive genes *ZRT1*, *ZRT2*, and *PRA1* were expressed under the control of the constitutive *ADH1* promoter both in the *C. dubliniensis* wild-type strain Wü248 and in the *csr1*Δ/Δ mutant strains. All mutants were constructed as independent duplicates and gene deletions were confirmed by Southern blot analyses (see Fig. S1 in the supplemental material).

To investigate the role of Csr1 for zinc acquisition in *C. dubliniensis*, growth of prestarved (24 h without zinc) wild-type and mutants strains was monitored for 2 days in defined medium (LZM) with no (0 μM), little (25 μM), or plentiful (2,000 μM) zinc. The prestarvation step was designed to largely deplete the internal zinc storage, so that fungal growth depended on the ability to acquire zinc from the surrounding medium.

The growth of wild-type and all mutant strains was nearly abolished when no zinc was added to the LZM (Fig. 2A). Under low-zinc conditions (25 μM ZnSO₄), all *C. dubliniensis* strains harboring at least one intact CSRI allele proliferated robustly and at a rate virtually identical to the wild-type strain Wü284, whereas most mutants lacking CSRI (the *csr1*Δ/Δ, *csr1*Δ/Δ+*ZRT1*^{OE}, and *csr1*Δ/Δ+*PRA1*^{OE} strains) failed to adapt and grow in the low-zinc medium (Fig. 2B). Only artificial overexpression of *ZRT2* in the *csr1*Δ/Δ mutant could largely phenocopy wild-type growth under low-zinc conditions (Fig. 2B).

Addition of 2,000 μM ZnSO₄ to the LZM rescued the growth defect of all *csr1*Δ/Δ mutant strains (Fig. 2C). We concluded that Csr1 is a key regulator of *C. dubliniensis* for growth in environments with low zinc. While overexpression of neither *ZRT1* nor *PRA1* in the *csr1*Δ/Δ background improved growth under conditions of low zinc, the *ZRT2* overexpression mutant displayed intermediate growth in LZM plus 25 μM ZnSO₄, which indicates that this zinc transporter may play an important role under conditions of low zinc.

The upregulation of CSRI and its target genes facilitates adaption to low zinc. In *S. cerevisiae*, more than 40 putative target genes of Zap1 are known. All of these are regulated in response to zinc levels and contain zinc-responsive elements (ZREs) to which Zap1 binds (40). Additionally, *C. albicans* Csr1 is known to control not only zinc homeostasis but also the hypha-associated gene *HWP1* under filament-inducing conditions (11) and during biofilm formation (18). To determine whether selected homologs of

these target genes are also zinc responsive in *C. dubliniensis*, the transcription levels of genes encoding putative zinc transporters (*ZRT1* to *ZRT3*), the zincophore gene *PRA1*, and the hypha-associated gene *HWP1* were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Cells were precultured for 24 h in LZM plus 2,000 μM ZnSO₄ before these LZM-adapted cells were shifted into LZM without added zinc. This ensured that changes in gene expression were solely due to zinc deficiency and not the medium *per se*. At 2,000 μM zinc in the preculture, the *csr1*Δ/Δ mutant strains proliferated at wild-type levels (Fig. 2C). The relative gene expression was normalized to *TEF3*, an established *C. dubliniensis* reference gene used for Northern blot analyses (41).

In the wild-type strain Wü284, a 10-fold increase of CSRI mRNA levels was observed within the first 4 h of starvation, reflecting the transcriptional response to the absence of external zinc. The transcript levels remained highly elevated until the end of the experiment at 24 h (1,440 min) (Fig. 3A). This gives additional support to the presumptive key role for CSRI in the upkeep of zinc homeostasis. All *ZRT* genes were highly (>20×) upregulated at 24 h. By 4 h, the expression of the putative low-affinity zinc transporter *ZRT2* and the vacuolar zinc exporter *ZRT3* was increased 37-fold and 7-fold, respectively. In contrast, *ZRT1* (likely encoding a high-affinity zinc transporter) transcript levels slightly decreased within the first 4 h but reached a 125-fold upregulation after 24 h compared to the zero time point. The transcript level of *PRA1* reached its measured maximum after 24 h, where this zincophore-encoding gene showed the highest transcript level of all genes investigated in the wild-type strain.

Morphologically, no hypha formation was observed under zinc limitation (data not shown), in agreement with a negligible mRNA level of *HWP1* at all time points (compared to *TEF3*) in the wild type. As expected, no CSRI gene expression was measured in the *csr1*Δ/Δ mutant, and in addition, transcript levels of the *ZRT* genes and of *PRA1* were significantly decreased compared to those in the wild type (Fig. 3B). The absolute amount of *ZRT1* transcripts was mostly below the detection limit, showing its dependency on Csr1 during zinc depletion. A slight increase was observed for *ZRT2*, *ZRT3*, and *PRA1* mRNA levels after 24 h, suggesting that their expression is regulated by other factors in addition to Csr1. Reintroduction of one CSRI allele into the *csr1*Δ/Δ mutant restored the overall expression pattern of CSRI as well as of the other zinc-responsive genes, although the transcript amounts of *ZRT3* and *PRA1* did not fully achieve the level of the wild type (compared to *TEF3*) (Fig. 3C). Reintroduction of CSRI hence largely restored the transcriptional response to zinc limitation.

Morphology of *C. dubliniensis* is not coupled to CSRI. Previously, Kim et al. reported a filamentation defect for the *C. albicans* *csr1*Δ/Δ mutant in serum-containing medium (11). To test the possible relevance of *C. dubliniensis* Csr1 for initiation of germ tubes, the wild type, the *csr1*Δ/Δ mutant, and the revertant were tested for germ tube induction in water with 10% serum or in liquid spider medium at 37°C. Invariably, all strains formed proper germ tubes under these filament-inducing conditions (Fig. 4). In addition, germ tube formation was tested for the overexpressing strains *ZRT1*^{OE}, *ZRT2*^{OE}, *PRA1*^{OE}, *csr1*Δ/Δ+*ZRT1*^{OE}, *csr1*Δ/Δ+*ZRT2*^{OE}, and *csr1*Δ/Δ+*PRA1*^{OE}. No difference relative to the wild-type phenotype was detected in any strain (data not shown). These results confirm the findings from our gene expression analysis of *HWP1*, and together they demonstrate that in *C.*

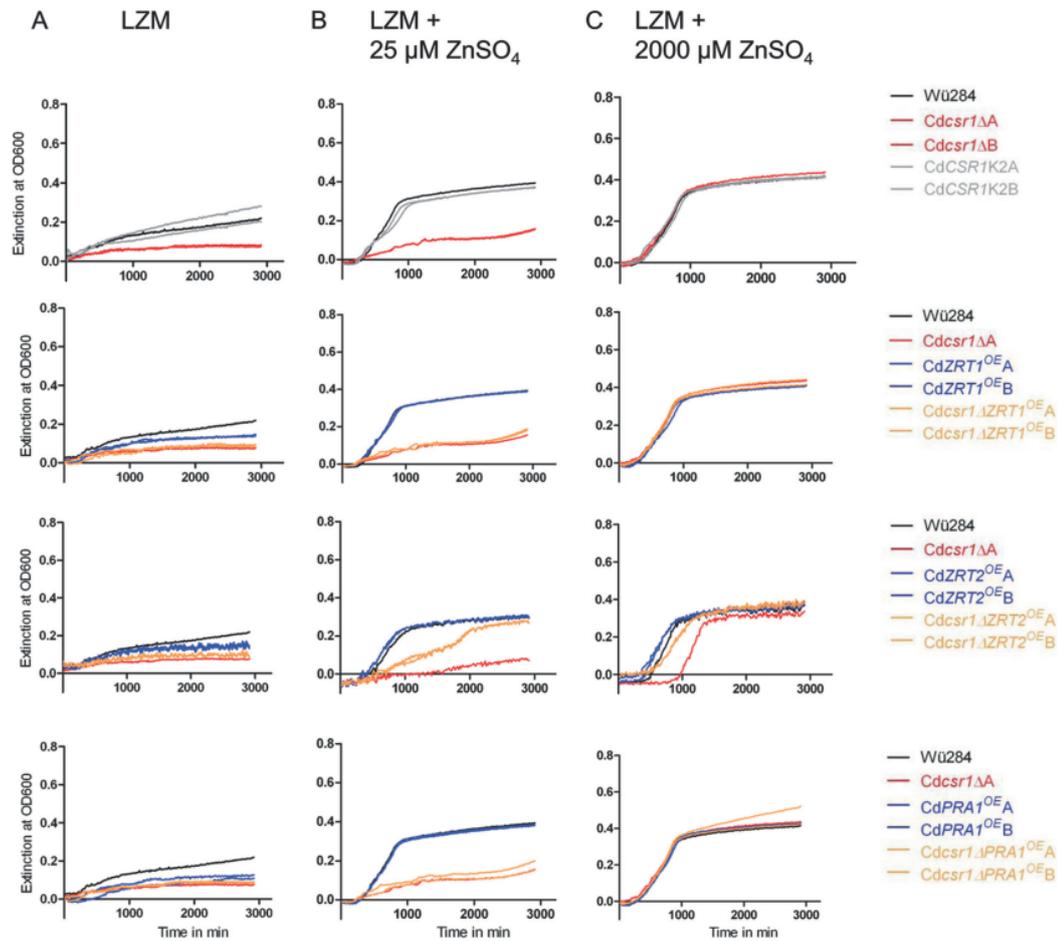


FIG 2 Growth of wild-type and mutant strains depends on extracellular zinc levels. *C. dubliniensis* Wü284 and the *csr1Δ/Δ*, *csr1Δ/Δ+CSR1*, *ZRT1^{OE}*, *csr1Δ/Δ+ZRT1^{OE}*, *ZRT2^{OE}*, *csr1Δ/Δ+ZRT2^{OE}*, *PRA1^{OE}*, and *csr1Δ/Δ+PRA1^{OE}* strains were assayed for growth. Cells were prestarved in LZM0 for 24 h at 30°C, and afterwards strains were grown in LZM without zinc (A) and with addition of 25 µM (B) or 2000 µM (C) ZnSO₄. At the starting point, the optical density at 600 nm was adjusted to 0.01, and changes were monitored every 15 min for 48 h.

dubliniensis, in contrast to *C. albicans*, hypha formation is not regulated by Csr1 under all our investigated conditions.

The simultaneous deletion of two zinc transporter genes *TZN1* and *TZN2* in *Neurospora crassa* caused a growth defect under zinc depletion conditions, and this double mutant strain failed to exhibit conidiation (42). In this context, we tested production of chlamydospores on Staib and rice agar under chlamydospore-inducing conditions (see Fig. S3 in the supplemental material). All strains analyzed in this study were able to produce these morphological structures in wild-type-like quality and quantity.

CSR1 is crucial for full virulence of *C. dubliniensis* in vivo. To study the role of *CSR1* during an infection with *C. dubliniensis*, we used the embryonated chicken egg model (36). We compared the

virulence of the *C. dubliniensis* wild type, the *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* mutants, and the respective complemented strains. To allow a better estimate of *C. dubliniensis*' virulence, we analyzed the *C. albicans* wild-type strain SC5314 in parallel. *C. albicans* is known to generally have a higher virulence than *C. dubliniensis* (16), which was confirmed in our study. The average survival rate 7 days after *C. albicans* infections *in ovo* was 14%, whereas *C. dubliniensis* infections were survived by 44% of the embryonated eggs at the end of the experiment (Fig. 5). One of the independent *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* deletion mutants showed a significantly decreased mortality rate (33%) versus the *C. dubliniensis* wild type (56%) and both reconstituted strains (62% and 67%). The second *csr1Δ/Δ* mutant (*csr1Δ/ΔB*) similarly exhibited a clear, but not

Böttcher et al.

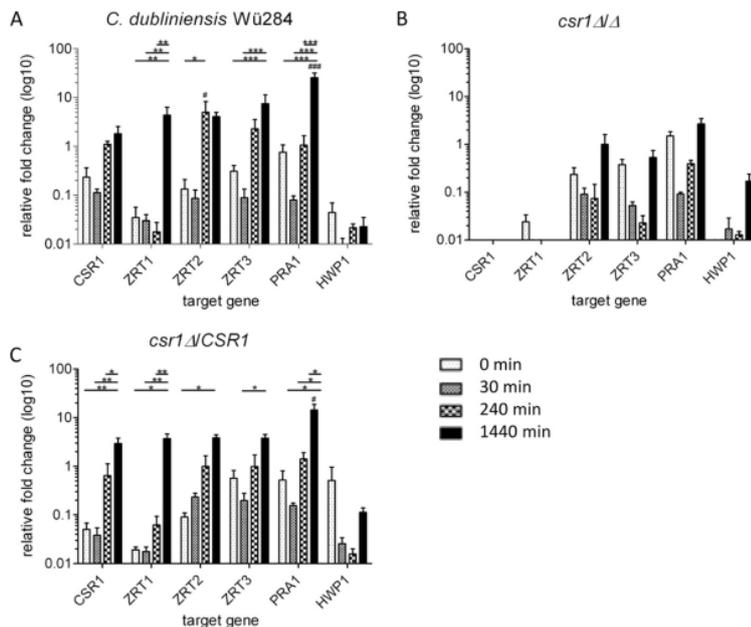


FIG 3 qRT-PCR gene expression analysis of putative Csr1 target genes in the wild-type strain Wü284 (A), the *csr1Δ/Δ* knockout strain (B), and the *csr1Δ/CSR1* revertant strain (C). The analyzed genes (*CSR1*, *ZRT1*, *ZRT2*, *ZRT3*, *PRA1*, and *HWP1*) are putatively regulated by Csr1. The cells were grown in LZM0 medium, and RNA samples were taken directly after inoculation in LZM0 and 30 min, 240 min, and 1,440 min postinoculation. The bars represent the relative change in expression normalized to expression of the housekeeping gene *CdTEF3*, and the results are the means and standard deviations (SD) from two biological and three technical replicates. The change in expression was significant (one-way analysis of variance [ANOVA], $P < 0.05$) within one strain (*) or compared to the expression level in the *csr1Δ/Δ* knockout strain at the same sampling time point (#).

statistically significant, attenuated virulence with a mortality rate of 46%. The reintegration of *CSR1* into the knockout strains restored the virulence pattern of the wild type. These observations indicate an important role for *CSR1* during *in vivo* infections by *C. dubliniensis*.

DISCUSSION

C. dubliniensis is an important emerging pathogen but is generally considered less virulent than *C. albicans* (43, 44). While the two fungi share many similarities, genetic, regulatory, and/or phenotypic differences must exist between them to explain this gap in virulence potential (16). The very close evolutionary relationship between *C. dubliniensis* and *C. albicans* can thus provide us with important tools to investigate the genetic basis of virulence in fungi.

One important aspect of host-pathogen interaction is the struggle for micronutrients like iron and zinc (45). In this study, we hence focused on the role of the transcriptional factor Csr1 and other putative zinc-responsive genes in zinc homeostasis of *C. dubliniensis*. Between *C. dubliniensis* and *C. albicans*, the transcriptional regulators CdCsr1 and CaCsr1 share a high sequence similarity. Both differ in the N-terminal zinc-responsive activation domains from their *S. cerevisiae* homolog, the zinc-dependent regulator Zap1 (46). Both *Candida* species lack AD1 and AD2 (11 and this study). In *S. cerevisiae*, AD1 binds multiple Zn(II)

ions and is required for proper catalytic function (47). The absence of the ADs indicates differences in the structure of this zinc-responsive regulator between *S. cerevisiae* and the *Candida* species. In support of that, multiple zinc finger domains were predicted in the C-terminal region of both CdCsr1 and CaCsr1, which could allow zinc binding even in the absence of the ADs. Two out of seven C₂H₂ domains in both Csr1 proteins were predicted with low confidence, and other authors thus describe only five zinc finger domains in CaCsr1 (11, 48).

More than 270 genes are known to have lower transcription levels in a *C. albicans* *csr1Δ/Δ* mutant compared to the wild type during biofilm formation (18). The largest differences in expression were found for the zinc homeostasis genes *PRA1*, *CSR1*, *ZRT2*, and *ZRT1*. Our data indicate that *C. dubliniensis* Csr1 shares these target genes with *C. albicans*, as all four genes were not upregulated during zinc limitation in the *csr1Δ/Δ* knockout strain.

In *C. albicans*, the *csr1Δ/Δ* mutant shows impaired growth under zinc limitation (11, 18). We observed a similar growth defect of the *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* mutant. However, in *C. albicans* *csr1Δ/Δ*, the overexpression of the zinc transporter genes *ZRT1* and *ZRT2* is known to improve growth of the mutant during zinc depletion (18), while overexpression of *ZRT1* or *PRA1* in *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* did not lead to any phenotypic rescue. The artificial expression of this zinc transporter or the zinc scavenger pro-

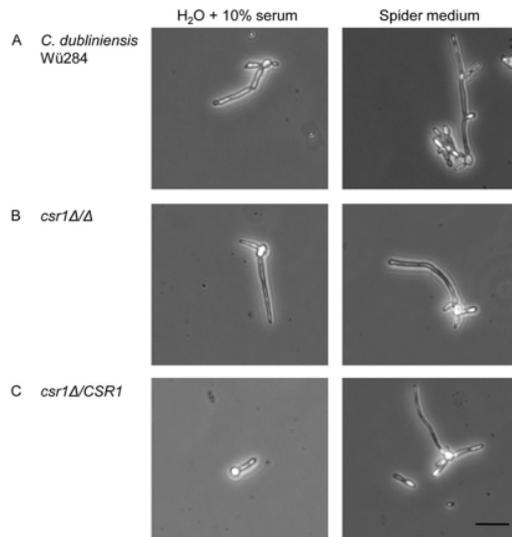


FIG 4 Filamentation of the wild-type strain Wü284, the *csr1Δ/Δ* mutant, and the *csr1Δ/CSR1* revertant in 10% (vol/vol) serum and spider medium. Cells were grown overnight in YPD at 30°C and shifted to germ tube-inducing medium for 4 h at 37°C. Germ tube induction was tested for Wü284 (A), the *csr1Δ/Δ* mutant (B), and the *csr1Δ/CSR1* strain (C) in water plus 10% serum and liquid spider medium. Cell morphology was documented via differential interference contrast microscopy. The bar represents 20 μm.

tein is evidently not sufficient to allow efficient zinc uptake by *C. dubliniensis*. Possibly, CdZRT1 is generally less efficient in zinc uptake than CaZRT1. Alternatively, both partners of the zincophore uptake system are required in *C. dubliniensis* for zinc acquisition. In *C. albicans*, zinc uptake can occur via a zincophore system comprising both Pra1 to sequester extracellular zinc ions and Zrt1 to transport zinc into the fungal cell (25). Based on their close genetic relationship, we expect a similar mechanism to be present in *C. dubliniensis*. Possibly, *C. albicans*, but not *C. dubliniensis*, has sufficient remaining transcriptional activation of PRA1 and ZRT1 in the absence of CSR1 to compensate for growth defects during artificial expression of only one reaction partner under low-zinc conditions.

On the other hand, overexpression of ZRT2 in the *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* mutant allowed growth under low-zinc conditions, which hints at an important role for this transporter in such environments. In *S. cerevisiae*, Zrt1 is known to be the high-affinity extracellular zinc transporter (21). Comparisons of the ScZrt1 protein with the *C. dubliniensis* proteome revealed a higher similarity with CdZrt2 (43% identities and 59% positives) than with CdZrt1 (27%/48%), in agreement with a recent report showing a rather distant relationship between ScZrt1 and its homologous proteins in several *Candida* species (49). Furthermore, regulatory ZREs were not detected in the promoter sequence of the two *Candida* species, which points to differences in the transcriptional regulation between *Candida* spp. and *S. cerevisiae*. Therefore, we hypothesize Zrt2, rather than Zrt1, to be the high-affinity zinc transporter in *C. dubliniensis*.

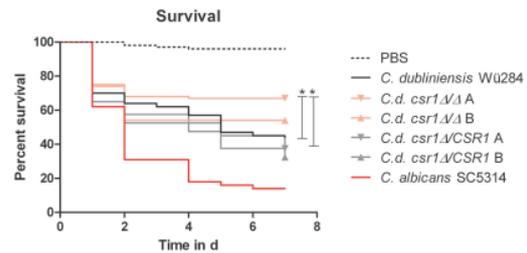


FIG 5 Virulence of the wild-type strain Wü284, the *csr1Δ/Δ* mutant, and the *csr1Δ/CSR1* revertant in infected chicken embryos. Survival after infection is depicted as Kaplan-Meier plots. There were 20 chicken embryos per group per experiment, and the combined results of two independent experiments are shown. The mutant *csr1Δ/Δ* exhibited significantly attenuated virulence ($P < 0.01$) compared with the wild type and the reconstituted mutant *csr1Δ/CSR1A*, as calculated by the log-rank (Mantel-Cox) test.

The zinc transporters Zrt1 and Zrt2 of *C. dubliniensis* exhibit only 30% amino acid sequence identity, suggesting nonredundant functions. Eide showed that in *S. cerevisiae*, the regulation of ZRT1 and ZAP1 transcription differs from that of ZRT2, with the first two being downregulated at higher zinc concentrations (50). This indicates, for baker's yeast, the presence of both a high-affinity zinc uptake system, comprising the regulator Zap1 and the transporter Zrt1, and a low-affinity zinc uptake system mediated by Zrt2 (20). Here, we measured the expression levels of putative zinc-responsive genes in a *C. dubliniensis* *csr1Δ/Δ* mutant and noticed a strong dependency of ZRT1 on CSR1.

Overall, data on ZRT2 gene expression in *S. cerevisiae* are contradictory. Bird et al. showed a peak in ZRT2 mRNA accumulation at 300 to 1,000 μM zinc (39). In a different study, a β-galactosidase activity assay demonstrated ZRT2 promoter activity under low-zinc conditions, which was reduced under conditions of increased zinc abundance (250 μM or more) (46). In our experiments, we observed a strong upregulation of *C. dubliniensis* ZRT2 during zinc depletion. ZRT2 transcription is hence in agreement with a role for Zrt2 as a high-affinity zinc transporter in *C. dubliniensis*.

A detailed study on the structural basis of the transcriptional regulation of ZRT2 in *S. cerevisiae* revealed that one of three ZREs (ZRE3) is located inside the promoter region. Zinc deprivation results in repressional binding of Zap1 to ZRE3, which inhibits the initiation of ZRT2 transcription (39). As we observed a significant upregulation of ZRT2 in the absence of zinc, promoter regions of ZRT2 in both *Candida* species were aligned with sequences from *S. cerevisiae*. The lack of the repressing ZRE3 domain in *Candida* species supports our finding that ZRT2 was upregulated during zinc limitation. These differences in the promoter sequence seem to be clade specific, as Bird et al. reported a conserved ZRT2 promoter region for different *Saccharomyces* species (39).

Furthermore, Eide suggested an at least partial independency of ZRT2 transcription from Zap1 in *S. cerevisiae* (50). We observed the same phenomenon in *C. dubliniensis* with a delayed and reduced but measurable upregulation of ZRT2 even in the *csr1Δ/Δ* background. Interestingly, in addition to ZRT2, ZRT3 and PRA1 also remained responsive to zinc starvation in a *csr1Δ/Δ* deletion mutant. Hence, additional factors besides Csr1 likely contribute to expression of zinc-responsive genes in *C. dubliniensis*. Finally, it is

known that *ZRT1* and *PRA1* share the same intergenic promoter region in *C. albicans*, which allows efficient zinc assimilation by their coregulation (25). The synteny of this *PRA1-ZRT1* locus is conserved in *C. dubliniensis*, and we detected largely synchronous shifts in gene expression during zinc starvation as long as *CSRI* was present.

S. cerevisiae stores zinc intracellularly under zinc-replete conditions via the vacuolar importer Zrc1. Under conditions of low extracellular zinc availability, this intracellular storage is accessed via the vacuolar zinc exporter Zrt3 (51). We observed a clear upregulation of *ZRT3* in *C. dubliniensis* within 4 h of zinc starvation. Likely, the cells had filled their vacuolar storage during the adaptation phase in 2,000 μ M zinc, which was then used to maintain zinc homeostasis under starvation. We found *ZRT3* upregulation to be dependent on Csr1, as *ZRT3* expression never exceeded the initial levels in the *csr1* Δ/Δ mutant. This is in agreement with the Zap1-mediated upregulation of *ZRT3* in *S. cerevisiae* (51).

A highly interesting aspect of *Candida* pathobiology is that human infections with *C. dubliniensis* occur much less frequently than those with *C. albicans*. *C. dubliniensis* is also far less able to disseminate into the kidney and liver in oral-intragastrically infected mice. Histological analyses of these organs revealed that *C. dubliniensis* remained as yeast cells *in vivo*, whereas *C. albicans* formed true hyphae and caused major tissue damage (17). Due to their potential role as a pathogenicity factor differentiating *C. albicans* and *C. dubliniensis*, we characterized the ability of a *C. dubliniensis* *csr1* Δ/Δ deletion mutant to produce hyphae *in vitro*.

A filamentation defect has been observed for the *C. albicans* *csr1* Δ/Δ deletion mutant in inducing medium, accompanied by impaired gene expression of the hypha-associated *HWPI* gene (11). Similar hypha formation defects were observed in *in vitro*-grown biofilms and *in vivo* using a rat intravenous catheter model (18). In the same study, expression of hypha-associated genes like *HYR1*, *HWPI*, *IHD1*, and *RBT1* were found to be positively regulated by Csr1, while the yeast-specific *YWPI* was downregulated in a *C. albicans* wild-type biofilm (18).

Therefore, we investigated the capacity of *C. dubliniensis* *csr1* Δ/Δ to induce germ tubes and found no differences relative to the wild-type strain. Hence, in contrast to *C. albicans*, hypha induction is not coupled to the zinc-responsive transcription factor Csr1 in *C. dubliniensis*. This constitutes a species-specific phenotype which may help to explain the different *in vivo* morphologies of the two fungi. In fact, one of the main differentiation criteria between *C. dubliniensis* and *C. albicans* is the differences in regulation of true hypha formation (52). Compared to the common ancestor, *C. dubliniensis* underwent reductive evolution and pseudogenization, which affected several virulence factors, including genes known to be hypha associated in *C. albicans*. This includes the disappearance of members of the *SAP* gene family, *ALS3* and *HYR1*, and a strong divergence in the *HWPI* gene, among others (53). Interestingly, the latter two are also targets of Csr1 in *C. albicans* (18), which might contribute to the filamentation defect in the absence of *CSRI*. This offers a possible explanation for the filamentation of *C. dubliniensis* even with a *csr1* Δ/Δ background. Interestingly, a *C. albicans* *csr1* Δ/Δ mutant was also shown to produce less of the quorum-sensing molecule farnesol during biofilm formation (19). As farnesol is also able to block hypha formation in *C. dubliniensis* (54), our data hint at possible species-specific differences in the relation of CdCsr1 and CaCsr1 to farnesol production and/or detection.

A supply of micronutrients like zinc is essential for a microbial pathogen to survive and disseminate during an infection. Previous studies have shown that orthologs of Csr1 are essential for pathogenicity of different fungal pathogens: A murine infection with *zap1* and *zafA* knockout strains resulted in milder forms of cryptococcosis and aspergillosis, respectively (48, 55). Very recently, the effect of a *C. albicans* *csr1* Δ/Δ deletion on virulence in mice and the associated transcriptome changes were assayed (27). In the present work, we used the embryonated egg infection model (36) for the first time to examine the virulence of wild type and mutant *C. dubliniensis*. This alternative infection model reflected the species-specific differences in virulence observed in human infections with *C. albicans* and *C. dubliniensis*. The survival rate of chicken embryos infected with *C. dubliniensis* Wü284 (44%) was more than three times higher than after infection with *C. albicans* SC5314 (14%) and paralleled previously published data on murine infections (68% versus 19% survival) (56).

The attenuated virulence of the *C. dubliniensis* *csr1* Δ/Δ strains is of special interest, as hypha formation was still intact *in vitro*, and these results thus hint at an important role for zinc homeostasis during *C. dubliniensis* infections. This is also in agreement with data for *CSRI* in *C. albicans* obtained by infection experiments in mice, where *csr1* Δ/Δ cells were strongly depleted in infected kidneys (26, 27). However, in *C. albicans*, a lack of filamentation by the *CSRI* mutation may have played an additional or even dominant role besides the defect in zinc supply, although the *C. albicans* *csr1* Δ/Δ mutant showed no reduction in hypha-associated gene expression during kidney invasion (27). Likely, important differences exist in hypha-related gene regulation by CdCsr1 and CaCsr1 (Zap1) *in vitro* and *in vivo*. Thus, our data provide an important hint at an independent contribution of the zinc supply to the success of fungal infection. Interestingly, the few virulence-associated genes verified in *C. dubliniensis* are generally associated with hypha formation, e.g., via calcineurin signaling (57) or telomere-associated open reading frames (ORFs) (58). Csr1, in contrast, seems to be a virulence factor that is not mandatorily linked to a global filamentation defect.

In conclusion, we found that zinc homeostasis regulation by Csr1 seems to be generally conserved among *C. dubliniensis*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae*, although there are important differences, especially with regard to its role in hypha formation. Furthermore, we identified Csr1 as a virulence factor in *C. dubliniensis*, which underlines the general relevance of micronutrient supply during fungal infections.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grant STA 1147/1-1 and by the Hans-Knöll-Institute. This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Health (BMBF) Germany, FKZ, 01EO1002, Integrated Research and Treatment Center, Center for Sepsis Control and Care (CSCC).

We thank Volha Skrahina and Daniela Schulz for technical assistance and advice and Duncan Wilson for stimulating discussions and his intellectual input.

REFERENCES

- Sharma A, Patni B, Shankhdhar D, Shankhdhar SC. 2013. Zinc—an indispensable micronutrient. *Physiol Mol Biol Plants* 19:11–20. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-012-0139-1>.
- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. 2006. Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* 5:3173–3178. <http://dx.doi.org/10.1021/pr0603699>.

3. Arora G, Sajid A, Arulanandh MD, Misra R, Singhal A, Kumar S, Singh LK, Mattoo AR, Raj R, Maiti S, Basu-Modak S, Singh Y. 2013. Zinc regulates the activity of kinase-phosphatase pair (BasPrkC/BasPrpC) in *Bacillus anthracis*. *Biomaterials* 26:715–730. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-013-9646-y>.
4. Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K. 2009. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* 71: 240–252. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06528.x>.
5. Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol Biol Cell* 15:456–467. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-03-0179>.
6. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 56:397–415. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04557.x>.
7. Kehl-Fie TE, Skaar EP. 2010. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* 14:218–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpcb.2009.11.008>.
8. Wilson D, Citiulo F, Hube B. 2012. Zinc exploitation by pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 8:e1003034. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003034>.
9. Porcheron G, Garenoux A, Proulx J, Sabri M, Dozois CM. 2013. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic *Enterobacteriaceae*: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 3:90. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00090>.
10. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A. 2007. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 75: 5867–5876. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00559-07>.
11. Kim MJ, Kil M, Jung JH, Kim J. 2008. Roles of zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* 18:242–247.
12. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39:309–317. <http://dx.doi.org/10.1086/421946>.
13. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, Gow NA, Jones BL. 2007. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol* 56:1066–1075. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47239-0>.
14. Giri S, Kindo AJ. 2012. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol* 30:270–278. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.99484>.
15. Koga-Ito CY, Komiya EY, Martins CA, Vasconcellos TC, Jorge AO, Carvalho YR, do Prado RF, Balducci I. 2011. Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *Mycoses* 54:e278–e285. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01899.x>.
16. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. 2012. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: why is *C. albicans* more pathogenic? *Int J Microbiol* 2012:205921. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/205921>.
17. Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. 2007. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 44:920–931. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2006.11.014>.
18. Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS, Nantel A, Andes DR, Johnson AD, Mitchell AP. 2009. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol* 7:e1000133. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000133>.
19. Ganguly S, Bishop AC, Xu W, Ghosh S, Nickerson KW, Lanni F, Patton-Vogt J, Mitchell AP. 2011. Zap1 control of cell-cell signaling in *Candida albicans* biofilms. *Eukaryot Cell* 10:1448–1454. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.05196-11>.
20. Zhao H, Eide D. 1996. The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:23203–23210. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.38.23203>.
21. Zhao H, Eide D. 1996. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2454–2458. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.6.2454>.
22. Zhao H, Eide DJ. 1997. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17:5044–5052.
23. Vicente-franqueira R, Moreno MA, Leal F, Calera JA. 2005. The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot Cell* 4:837–848. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.4.5.837-848.2005>.
24. Boch A, Trampczynska A, Simm C, Taudte N, Kramer U, Clemens S. 2008. Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance. *FEMS Yeast Res* 8:883–896. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00414.x>.
25. Citiulo F, Jacobsen ID, Miramon P, Schild L, Brunke S, Zipfel P, Brock M, Hube B, Wilson D. 2012. *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog* 8:e1002777. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002777>.
26. Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. 2010. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet* 42:590–598. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.605>.
27. Xu W, Solis NV, Ehrlich RL, Woolford CA, Filler SG, Mitchell AP. 2015. Activation and alliance of regulatory pathways in *C. albicans* during mammalian infection. *PLoS Biol* 13:e1002076. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002076>.
28. Staib F, Arasteh K. 2001. Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* 44: 23–27.
29. Hennicke F, Grumbt M, Lermann U, Ueberschaar N, Palige K, Böttcher B, Jacobsen ID, Staib C, Morschhäuser J, Monod M, Hube B, Hertweck C, Staib P. 2013. Factors supporting cysteine tolerance and sulfite production in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 12:604–613. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00336-12>.
30. Staib P, Lermann U, Blass-Warmuth J, Degel B, Wurzner R, Monod M, Schirmeister T, Morschhäuser J. 2008. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 146–156. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01072-07>.
31. Svobodova E, Staib P, Losse J, Hennicke F, Barz D, Jozsi M. 2012. Differential interaction of the two related fungal species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* with human neutrophils. *J Immunol* 189:2502–2511. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200185>.
32. Kohler GA, White TC, Agabian N. 1997. Overexpression of a cloned *IMP* dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* 179:2331–2338.
33. Reuss O, Vik A, Kolter R, Morschhäuser J. 2004. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341:119–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.021>.
34. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5857–5864. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.11.5857>.
35. Erb I, Gonzalez-Vallinas JR, Bussotti G, Blanco E, Eyra E, Notredame C. 2012. Use of ChIP-Seq data for the design of a multiple promoter-alignment method. *Nucleic Acids Res* 40:e52. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr1292>.
36. Jacobsen ID, Grosse K, Berndt A, Hube B. 2011. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *PLoS One* 6:e19741. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019741>.
37. Letunic I, Doerks T, Bork P. 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* 40:D302–D305. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr931>.
38. Bird AJ, Zhao H, Luo H, Jensen LT, Srinivasan C, Evans-Galea M, Winge DR, Eide DJ. 2000. A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator. *EMBO J* 19:3704–3713. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.14.3704>.
39. Bird AJ, Blankman E, Stillman DJ, Eide DJ, Winge DR. 2004. The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in *ZRT2*. *EMBO J* 23:1123–1132. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600122>.
40. Lyons TJ, Gasch AP, Gaither LA, Botstein D, Brown PO, Eide DJ. 2000.

- Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7957–7962. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.14.7957>.
41. Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. 1998. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1819–1830.
 42. Kiranmayi P, Tiwari A, Sagar KP, Haritha A, Maruthi Mohan P. 2009. Functional characterization of *tzn1* and *tzn2*-zinc transporter genes in *Neurospora crassa*. *Biomaterials* 22:411–420. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-008-9177-0>.
 43. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, Coleman DC. 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 4:369–376. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00240-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00240-X).
 44. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. 2005. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett* 253:9–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.015>.
 45. Hood MI, Skaar EP. 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10:525–537. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2836>.
 46. Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S, Eide D. 1998. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the *ZAP1* transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* 273:28713–28720. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.44.28713>.
 47. Herbig A, Bird AJ, Swierczek S, McCall K, Mooney M, Wu CY, Winge DR, Eide DJ. 2005. Zap1 activation domain 1 and its role in controlling gene expression in response to cellular zinc status. *Mol Microbiol* 57:834–846. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04734.x>.
 48. Schneider Rde O, Fogaca Nde S, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH, Staats CC. 2012. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 7:e43773. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043773>.
 49. Wilson D. 5 February 2015. An evolutionary perspective on zinc uptake by human fungal pathogens. *Metalomics* <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00331d>.
 50. Eide DJ. 2003. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* 133:1532S–1535S.
 51. MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19:2845–2855. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.12.2845>.
 52. O'Connor L, Caplice N, Coleman DC, Sullivan DJ, Moran GP. 2010. Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* is governed by nutrient regulation of *UME6* expression. *Eukaryot Cell* 9:1383–1397. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00042-10>.
 53. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, Aslett M, Barrell JF, Butler G, Citiulo F, Coleman DC, de Groot PW, Goodwin TJ, Quail MA, McQuillan J, Munro CA, Pain A, Poulter RT, Rajandream MA, Renauld H, Spiering MJ, Tivey A, Gow NA, Barrell B, Sullivan DJ, Berriman M. 2009. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res* 19:2231–2244. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.097501.109>.
 54. Henriques M, Martins M, Azeredo J, Oliveira R. 2007. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. *Lett Appl Microbiol* 44:199–205. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02044.x>.
 55. Moreno MA, Ibrahim-Granet O, Vicentefranqueira R, Amich J, Ave P, Leal F, Latge JP, Calera JA. 2007. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* 64:1182–1197. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05726.x>.
 56. Vilela MM, Kamei K, Sano A, Tanaka R, Uno J, Takahashi I, Ito J, Yariita K, Miyaji M. 2002. Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*. *Med Mycol* 40:249–257. <http://dx.doi.org/10.1080/mmy.40.3.249.257>.
 57. Chen YL, Brand A, Morrison EL, Silao FG, Bigol UG, Malbas FF, Jr, Nett JE, Andes DR, Solis NV, Filler SG, Averette A, Heitman J. 2011. Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryot Cell* 10:803–819. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00310-10>.
 58. Haran J, Boyle H, Hokamp K, Yeomans T, Liu Z, Church M, Fleming AB, Anderson MZ, Berman J, Myers LC, Sullivan DJ, Moran GP. 2014. Telomeric ORFs (TLOs) in *Candida* spp. encode mediator subunits that regulate distinct virulence traits. *PLoS Genet* 10:e1004658. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004658>.
 59. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. 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. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00328721>.
 60. Morschhäuser J, Ruhnke M, Michel S, Hacker J. 1999. Identification of CARE-2-negative *Candida albicans* isolates as *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42:29–32. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00259.x>.

4.2 Manuskript 2: Chlamydosporen-spezifische Marker

„Global Transcriptome Sequencing Identifies Chlamyospore Specific Markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.“ [151]

Katja Palige, Jörg Linde, Ronny Martin, Bettina Böttcher, Francesco Citiulo, Derek J. Sullivan, Johann Weber, Claudia Staib, Steffen Rupp, Bernhard Hube, Joachim Morschhäuser, Peter Staib

Veröffentlichtes Manuskript (gedruckt am 15.04.2013):

PLOS One. April 2013 8(4): e61940. doi:10.1371/journal.pone.0061940.

Inhaltsangabe

Candida albicans und *C. dubliniensis* sind die einzigen Vertreter der Gattung *Candida*, die in einem bisher wenig verstandenen Prozess Chlamydosporen produzieren können. In dieser Studie wurden die transkriptionellen Veränderungen analysiert, die mit der Bildung dieser dickwandigen Zelltypen einhergehen. Dazu wurden zwei chlamydosporenproduzierende Stämme – der *C. dubliniensis*-Wildtyp und eine *nrg1Δ/Δ*-Deletionsmutante von *C. albicans* – mit dem nichtsporulierenden *C. albicans*-Wildtyp per RNA-Sequenzierungsanalysen verglichen. Es wurde eine Reihe chlamydosporenassoziierter Gene identifiziert, die größtenteils für strukturelle Komponenten der Sporenzellwand kodieren. Die zwei transkriptionell am meisten präsenten Gene *CSP1* und *CSP2* wurden als fluoreszierende GFP-Translationsfusionsproteine in *C. albicans* und *C. dubliniensis* exprimiert, die dann spezifisch in Chlamydosporen lokalisiert vorgefunden wurden. Neben den Erkenntnissen zur genetischen Basis der Chlamydosporulation werden diese neuartigen Chlamydosporen-Reporterstämme zukünftigen Analysen von putativen Sporulationsereignissen unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen dienen.

Eigenanteil

Bettina Böttcher hat 50% der GFP-Reporterstämme konstruiert, deren Genotypen mittels Southern Blot-Analysen überprüft und die Transformanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Des Weiteren hat sie zur Erstellung der Abbildungen und dem Bearbeiten des Manuskripttexts beigetragen.

Geschätzter prozentualer Anteil der Autoren

Katja Palige:	45%	Jörg Linde:	10%
Ronny Martin:	10%	Bettina Böttcher:	10%
Francesco Citiulo:	2%	Derek J. Sullivan:	2%
Johann Weber:	2%	Claudia Staib:	1%
Steffen Rupp:	2%	Bernhard Hube:	2%
Joachim Morschhäuser:	2%	Peter Staib:	12%

Bernhard Hube

Global Transcriptome Sequencing Identifies Chlamydospore Specific Markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*

Katja Palige¹, Jörg Linde², Ronny Martin³, Bettina Böttcher¹, Francesco Citiulo^{4,5}, Derek J. Sullivan⁵, Johann Weber⁶, Claudia Staib⁷, Steffen Rupp⁸, Bernhard Hube^{4,9,10}, Joachim Morschhäuser¹¹, Peter Staib^{1,12*}

1 Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, Junior Research Group Fundamental Molecular Biology of Pathogenic Fungi, Jena, Germany, **2** Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, Systems Biology/Bioinformatics, Jena, Germany, **3** Center for Innovation Competence Septomics, Research Group Fungal Septomics at the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, Jena, Germany, **4** Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, Molecular Pathogenicity Mechanisms, Jena, Germany, **5** School of Dental Science and Dublin Dental University Hospital, Trinity College Dublin, University of Dublin, Dublin, Ireland, **6** Lausanne Genomic Technologies Facility, Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, **7** Department of Obstetrics and Gynecology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, **8** Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Stuttgart, Germany, **9** Friedrich Schiller University, Jena, Germany, **10** Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, Jena, Germany, **11** Institute for Molecular Infection Biology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, **12** Department of Research and Development, Kneipp-Werke, Würzburg, Germany

Abstract

Candida albicans and *Candida dubliniensis* are pathogenic fungi that are highly related but differ in virulence and in some phenotypic traits. During *in vitro* growth on certain nutrient-poor media, *C. albicans* and *C. dubliniensis* are the only yeast species which are able to produce chlamydospores, large thick-walled cells of unknown function. Interestingly, only *C. dubliniensis* forms pseudohyphae with abundant chlamydospores when grown on Staib medium, while *C. albicans* grows exclusively as a budding yeast. In order to further our understanding of chlamydospore development and assembly, we compared the global transcriptional profile of both species during growth in liquid Staib medium by RNA sequencing. We also included a *C. albicans* mutant in our study which lacks the morphogenetic transcriptional repressor Nrg1. This strain, which is characterized by its constitutive pseudohyphal growth, specifically produces masses of chlamydospores in Staib medium, similar to *C. dubliniensis*. This comparative approach identified a set of putatively chlamydospore-related genes. Two of the homologous *C. albicans* and *C. dubliniensis* genes (*CSP1* and *CSP2*) which were most strongly upregulated during chlamydospore development were analysed in more detail. By use of the green fluorescent protein as a reporter, the encoded putative cell wall related proteins were found to exclusively localize to *C. albicans* and *C. dubliniensis* chlamydospores. Our findings uncover the first chlamydospore specific markers in *Candida* species and provide novel insights in the complex morphogenetic development of these important fungal pathogens.

Citation: Palige K, Linde J, Martin R, Böttcher B, Citiulo F, et al. (2013) Global Transcriptome Sequencing Identifies Chlamydospore Specific Markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. PLoS ONE 8(4): e61940. doi:10.1371/journal.pone.0061940

Editor: Neeraj Chauhan, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, United States of America

Received: December 11, 2012; **Accepted:** March 7, 2013; **Published:** April 15, 2013

Copyright: © 2013 Palige et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant STA 1147/1-1) and the Hans Knoell Institute. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Peter.Staib@hki-jena.de

Introduction

The pathogenic yeast *Candida albicans* represents the clinically most important member of the genus *Candida* [1]. Although *C. albicans* is a harmless member of the normal microflora in healthy people, the species can cause life-threatening, disseminated infections in immunocompromised patients [2]. In medical routine diagnosis, *C. albicans* has been differentiated for a long time from other yeast-like fungi by a species-specific, morphogenetic characteristic, i.e. the formation of chlamydospores. These large, thick-walled, spherical cells are produced by *C. albicans* on specific nutrient-poor media such as rice-extract or corn meal agar at room temperature, typically from suspensor cells at the end of pseudohyphae [2,3,4,5,6]. Despite the importance of chlamydo-

spores for species identification, even today, the biological function of these entities remains enigmatic [5,7]. No role for chlamydospores has yet been identified in the life cycle of the microorganism or in fungal survival in the environment or in pathogenicity. Although readily inducible *in vitro*, chlamydospores have only rarely been observed *in vivo* [8,9]. Chlamydospore formation would appear to be a complex process that undoubtedly requires specific genes and regulatory pathways that have been retained since the divergence of *C. albicans* and *C. dubliniensis* approximately 20 million years ago. The question therefore remains why have these species retained the capacity to produce these complex and unusual structures and what exactly is their purpose in the *Candida* life cycle?

In contrast to hyphae formation, the program of chlamydo-spore development has only been studied poorly at the molecular level (for review see [5]). Some of the signaling pathways which control hyphae formation in *C. albicans* were also found to influence chlamydo-spore development, e.g. those involving transcriptional regulators Efg1 and Nrg1, or the stress-activated protein kinase Hog1 [10,11,12]. Other genes, which are likely implicated in chlamydo-spore formation have also been identified, for example by screening libraries of deletion mutants or by testing individual knock-out strains for their ability to efficiently develop these morphological structures [13,14]. However, so far no proteins have been identified which are specifically localized to chlamydo-spores. Such markers would be useful in the study of the morphogenetic development of these cellular entities, and would facilitate the differentiation of chlamydo-spores from other morphological growth forms.

Molecular analysis of chlamydo-spores has received increasing attention since the description of a new *Candida* species in 1995, *C. dubliniensis*. *C. dubliniensis* is closely related to *C. albicans* and displays many phenotypic characteristics that were assumed to be specific for *C. albicans*, including the ability to form true hyphae and chlamydo-spores [15,16,17]. Intriguingly, however, only *C. dubliniensis* was found to produce pseudo-hyphae and chlamydo-spores on Staib agar (syn. *Guizotia abyssinica* creatinine agar), where *C. albicans* grows as a budding yeast [18]. This species-specific characteristic was shown to be governed by a differential expression of the gene encoding the hyphal repressor Nrg1 in the two species. A *C. albicans* knock-out mutant in the *NRG1* gene, which is known for its constitutive pseudo-hyphal growth [19,20], produces chlamydo-spores specifically on Staib agar, similar to *C. dubliniensis* [12].

In the present study, we set out to identify chlamydo-spore specific markers in *Candida*. As a method, we investigated for the first time genome wide expression patterns in *Candida* species during chlamydo-spore development. In detail, global transcriptomes of *C. albicans* and *C. dubliniensis* wild-type strains as well as the *C. albicans nrg1Δ* mutant were monitored by RNA sequencing during growth in Staib medium. The comparison of the detected profiles allowed the identification of a set of highly expressed genes specifically related to chlamydo-spore development. For selected candidates, which code for putative cell wall proteins, the chlamydo-spore specific expression and the exclusive localization of the encoded proteins to chlamydo-spores was demonstrated by green fluorescent protein (GFP) fusion strains.

Materials and Methods

Strains and growth conditions

C. albicans and *C. dubliniensis* strains used in this work are listed in Table 1. Strains were routinely propagated on YPD agar (20 g peptone, 10 g yeast extract, 20 g glucose, 15 g agar per litre) at 30°C and stored as frozen stocks in liquid YPD medium with 15% (v/v) glycerol at -80°C. Chlamydo-spore formation in *C. albicans* and *C. dubliniensis* was induced by growth of the strains on rice-extract agar (Beckton, Dickinson and Company, Sparks, USA) at 25°C. Staib liquid medium was used for the specific induction of chlamydo-spore formation in *C. dubliniensis* and the *C. albicans nrg1Δ* mutant strain MMC3 at 25°C. Staib medium was prepared like Staib agar (syn. *Guizotia abyssinica* creatinine agar) as described previously [21,22], only the agar was omitted. In brief, 50 g pulverized *Guizotia abyssinica* plant seeds were boiled in 1 l of distilled water for 30 min, filtered and filled up to 1 l with water. Thereafter, 1 g glucose, 1 g KH₂PO₄ and 1 g creatinine were added before autoclaving for 20 min at 110°C.

Plasmid constructions

A DNA construct for the *CD36_30750-GFP* reporter fusion was generated as follows: upstream sequences plus the coding region of gene *CD36_30750* were amplified by PCR with primers Cd30750-1 and Cd30750-5, using genomic DNA from *C. dubliniensis* Wü284 as a template (all primers are listed in Table S1). Primer Cd30750-5 contains a BamHI-site which replaces the *CD36_30750* stop codon. The *GFP* gene lacking the start codon was cloned together with the *C. albicans ACT1T*-terminator by use of primers GFP1 and CaACT1T-1 and the *GFP-ACT1T* containing plasmid pSSU1G2 (unpublished data) as a template, resulting in pJetGFPACT1T1. The ApaI-BamHI *CD36_30750* fragment was cloned together with a BamHI-NcoI *GFP* fragment from pJetGFPACT1T1 in the ApaI/NcoI digested vector pSSU1G2, resulting in pCd30750G1. Finally, the downstream *SSU1* fragment in pCd30750G1 was replaced by a PstI-SacI *CD36_30750* downstream fragment obtained by PCR with primers Cd30750-6 and Cd30750-4. The resulting plasmid pCd30750G2 contains a DNA cassette which encodes *CD36_30750* which is fused at its last amino acid via Gly-Ser to the GFP (Figure S1). In the same way, GFP reporter fusions were constructed for the *C. dubliniensis* gene *CD36_40770* by use of primer pairs Cd40770-1/Cd40770-5 and Cd40770-6/Cd40770-4 and *C. albicans* genes *orf19.3512* (primer pairs 3512-1/3512-2 and 3512-3/3512-4) and *orf19.4170* (primer pairs 4170-1/4170-2 and 4170-3/4170-4), resulting in plasmids pCd40770G2, p3512G2 and p4170G2. A DNA cassette for the deletion of *CD36_30750* was constructed as follows: An ApaI-XhoI fragment with *CD36_30750* upstream sequences was cloned after PCR with the primers Cd30750-1 and Cd30750-2, using genomic DNA from *C. dubliniensis* Wü284 as a template. A SacII-SacI fragment with *CD36_30750* downstream sequences was obtained by PCR with the primers Cd30750-3 and Cd30750-4. The *CD36_30750* upstream and downstream fragments were successively cloned in order to flank the SAT1-flipper cassette as described before [23]. In the same way, a DNA cassette for the deletion of *C. dubliniensis* gene *CD36_40770* was constructed, using primer pairs Cd40770-1/Cd40770-2 and Cd40770-3/Cd40770-4, respectively.

C. albicans and *C. dubliniensis* transformant construction

C. albicans and *C. dubliniensis* were transformed by an electroporation protocol [24] with gel-purified, linear DNA fragments from the generated plasmids: the ApaI-SacI fragments from pCd30750G2, pCd40770G2, p3512G2 and p4170G2 for integration of the GFP reporter fusions into one of the native alleles of the corresponding genes in the wild-type strains *C. dubliniensis* Wü284 and *C. albicans* SC5314, respectively (Figure S1). The ApaI-SacI fragments from pCd30750M2 and pCd40770M2 were used to delete genes *CD36_30750* and *CD36_40770*, respectively, in *C. dubliniensis* Wü284 (Figure S2). Transformants were selected on nourseothricin (Werner Bioagents, Jena, Germany), and recycling of the selection marker by the SAT1-flipping method was carried out as described before [23]. The correct insertion of the constructs was confirmed by Southern analysis.

Southern analysis

Genomic DNA from *C. albicans* and *C. dubliniensis* was isolated as described previously [25]. A 10 µg sample of DNA was digested with appropriate restriction enzymes and separated on a 1% (w/v) agarose gel. After ethidium bromide staining, DNA was transferred by vacuum blotting onto a nylon membrane and fixed by UV cross-linking. Southern hybridization with enhanced chemiluminescence-labelled probes was performed with the Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection

Table 1. *C. albicans* and *C. dubliniensis* strains used in this study.

Candida strain	Parent	Genotype ^a	Reference
SC5314		<i>C. albicans</i> wild-type strain	[42]
WU284		<i>C. dubliniensis</i> wild-type strain	[43]
MMC3	CAI4	Canrg1Δ::hisG-CaURA3-hisG/Canrg1Δ::hisG	[20]
Ca3512G1A/B	SC5314	orf19.3512/orf19.3512-GFP-T _{ACT1}	This study
Cd30750G1A/B	WU284	CD36_30750/CD36_30750-GFP-T _{ACT1}	This study
Ca4170G1A/B	SC5314	orf19.4170/orf19.4170-GFP-T _{ACT1}	This study
Cd40770G1A/B	WU284	CD36_40770/CD36_40770-GFP-T _{ACT1}	This study
Cd30750M1A/B	WU284	CD36_30750Δ::SAT1-FLIP/CD36_30750	This study
Cd30750M2A/B	Cd30750M1A/B	CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750	This study
Cd30750M3A/B	Cd30750M2A/B	CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750Δ::SAT1-FLIP	This study
Cd30750M4A/B	Cd30750M3A/B	CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750Δ::FRT	This study
Cd40770M1A/B	WU284	CD36_40770Δ::SAT1-FLIP/CD36_40770	This study
Cd40770M2A/B	Cd40770M1A/B	CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770	This study
Cd40770M3A/B	Cd40770M2A/B	CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770Δ::SAT1-FLIP	This study
Cd40770M4A/B	Cd40770M3A/B	CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770Δ::FRT	This study

^aSAT1-FLIP denotes the SAT1 flipper cassette.
doi:10.1371/journal.pone.0061940.t001

System (GE Healthcare, Braunschweig, Germany) according to the instructions of the manufacturer.

RNA isolation and sequencing

Total RNA from *C. albicans* and *C. dubliniensis* was isolated by the hot acidic phenol method [26], purified by use of the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and DNase-treated on-column with the RNase-free DNase Set (Qiagen) for removing contaminations with genomic DNA. The integrity of total RNAs was analyzed on an Agilent Bioanalyzer by monitoring the RNA integrity number (RIN). Two μg of total RNA were used to extract polyadenylated RNA and to construct strand specific RNaseq libraries according to the Illumina protocol 'Directional mRNA-Seq Sample Preparation' (Part # 15018460 Rev. A) (Illumina, San Diego, USA). Briefly, polyadenylated RNA was enriched by two rounds of polyA selection with oligo-dT magnetic beads. The RNA was then chemically fragmented, treated with Antarctic phosphatase (NEB) and subsequently with polynucleotide kinase (NEB). V1.5 sRNA 3' Adapter was ligated to the RNA with T4 RNA ligase2 truncated (NEB), and SRA 5' Adapter was ligated to the RNA with T4 RNA Ligase. After ligation of the SRA RT primer, the RNA was reverse transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Double stranded sequencing library DNA was then produced by 12 cycles PCR with primers GX1 and GX2. DNA was purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter International S.A.). Library quality was validated with a Bioanalyzer 2100. Each sample was sequenced for 80 cycles on one lane of the Illumina Genome Analyzer IIX platform according to the manufacturers specifications. Yields per sample were 36 to 38 Mio pass filter reads (2.9 to 3.0 Gb).

RNA-seq data-processing

In order to map raw sequence reads to the respective genomes, we applied the Bowtie algorithm (version 0.12.7) [27]. For all three datasets >70% of reads mapped. We applied MAID filtering [28] in order to identify differentially expressed genes. Instead of a constant (log) fold-change cutoff, MAID filtering applies a MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change criterion. The

advantage is that genes which are lowly expressed in both datasets are not defined to be differentially expressed. Due to the absence of biological replicates, we relied on the experience that the variance is higher for genes expressed at low level. To find genes which are differentially expressed between *C. dubliniensis* and *C. albicans*, we used the definition of orthologous pairs given by the Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>).

Quantitative real-time (q)RT-PCR

One hundred ng of total RNA were used to perform qRT-PCR with a one step approach using the Brilliant III SYBR Green Ultra-Fast QRT PCR master mix kit (Agilent Technologies, La Jolla, USA). RT-PCR was performed on a Stratagene Mx3005P and the threshold cycle was determined by the instrument's MxPro software version 4.10 (Agilent Technologies, La Jolla, USA). By the $\Delta\Delta C_T$ method [29] expression was calculated and normalized to the expression of the *CaACT1/CdACT1* gene. For all samples, three biological replicates were analyzed. Data were expressed as the mean \pm SD. Differences were analyzed by the two-tailed unpaired Student's *t*-test, a *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

Analysis of DNA/protein sequence identity and similarity

Pairwise sequence alignments were conducted by use of the free available Needleman-Wunsch global alignment tool (Needle) at *The European Molecular Biology Open Software Suite* (emboss, <http://emboss.open-bio.org/>).

Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy was performed with a Zeiss Axio-Observer Z1 microscope equipped with a Zeiss HXP120C illuminator. Images were acquired by use of the corresponding filter settings for green fluorescent protein (GFP) and parallel/overlay transmission images. The cells were inspected with a x40 objective. Surface plot analysis to localize the fluorescence signal of CdCsp1/2-GFP was performed with ImageJ 1.46r.

Results and Discussion

***C. dubliniensis* wild type and the *C. albicans nrg1Δ* mutant form chlamydospores during growth in Staib liquid medium**

As previously reported, the *C. dubliniensis* wild type and the *C. albicans nrg1Δ* mutant produce chlamydospores during growth on Staib agar, in contrast to the *C. albicans* wild type [12]. First, we proved whether a similar, expected growth phenotype of the three analyzed strains is also displayed in Staib liquid medium [30], since liquid culture conditions facilitated the planned transcriptome analysis. We found an incubation for 28 h at 25°C optimal for chlamydospore analysis in Staib liquid medium. At this time point, both the *C. dubliniensis* wild type as well as the *C. albicans nrg1Δ* mutant exclusively grew in form of pseudohyphae, almost all of which produced chlamydospores at their terminal ends (Figure 1). It has to be noted that the *C. albicans nrg1Δ* mutant constitutively forms pseudohyphae, but not chlamydospores. Instead, the formation of chlamydospores by *C. albicans nrg1Δ* pseudohyphae is specifically induced in Staib medium, hence allowing the identification of putative chlamydospore related genes by comparative gene expression analysis.

Comparative RNA sequencing identifies putative chlamydospore specific genes

Total RNA from the three tested *Candida* strains, i.e. *C. albicans* wild type SC5314, *C. albicans* MMC3 (*nrg1Δ*) and *C. dubliniensis* wild type Wü284, was isolated after 28 h of growth in Staib liquid medium and used for global RNA sequence analysis (Materials and Methods). The complete results of pairwise relative gene expression comparisons of the three strains is depicted in Table S2. In order to identify differentially regulated genes, we applied the stringent MAID filtering approach (MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change) [28], permitting the removal of genes which are expressed at a low level in both compared conditions/strains. A set of putative chlamydospore formation related genes was obtained by comparing datasets from the *C. albicans nrg1Δ* mutant strain and the *C. dubliniensis* wild type with the *C. albicans* wild type. By this approach, we identified 25 strongly up- and 8 downregulated genes, respectively (Figure 2, Table 2), most of which were uncharacterized. Since chlamydospore related gene expression has not been monitored before on a global scale, the identification of many unknown function/uncharacterized genes points to the assumed specificity of the chlamydospore developmental program. Interestingly, many of the highly upregulated genes encode putative cell wall/plasma membrane associated

proteins, including *PGA13* and *PGA55* [31,32]. This finding suggests that chlamydospore cell walls contain a characteristic composition of proteins. Based on our findings specified further on in this work we designated the two highly upregulated genes *orf19.3512/CD36_30750* and *orf19.4170/CD36_40770* as *C. albicans* and *C. dubliniensis* 'Chlamydospore Specific Protein 1 and 2', i.e. *ca/cdCSP1* and *ca/cdCSP2*, respectively (Table 2).

The hyphal repressor Nrg1 was previously found to govern the differential chlamydospore phenotype of *C. albicans* and *C. dubliniensis* in Staib medium [12]. Therefore, it appears reasonable that some of the detected genes were previously related to filamentation and/or annotated as putative targets of Nrg1. Examples include *PGA13*, *PGA55* and *IHDI*, which encode putative glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins [31], the latter being named as 'induced during hyphae development' [20,33]. Other candidate target genes are the strongly upregulated unknown function gene *orf19.6741* as well as *UME6*, which is described as a filament specific regulator in *C.*

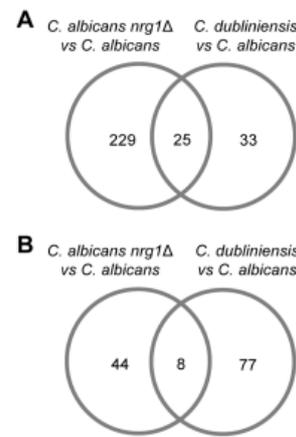


Figure 2. Identification of chlamydospore specific genes in *Candida*. Venn diagram of genes which were \geq two fold up- (A) and downregulated (B) in both the *C. albicans nrg1Δ* mutant and the *C. dubliniensis* wild type during growth in Staib medium. doi:10.1371/journal.pone.0061940.g002

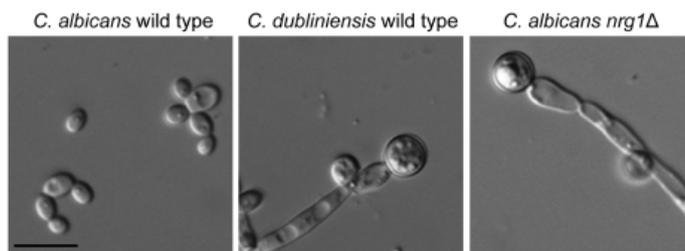


Figure 1. Differential chlamydospore development by the analyzed *Candida* strains in Staib liquid medium. *C. dubliniensis* wild type Wü284 and the *C. albicans nrg1Δ* mutant MMC3 form chlamydospores, in contrast to the *C. albicans* wild type SC5314. The fungal strains were grown for 28 h in Staib medium at 25°C and inspected by microscopy (scale bar: 10 μ m). doi:10.1371/journal.pone.0061940.g001

Table 2. Strongly differentially expressed genes in *C. albicans nrg1Δ* and *C. dubliniensis* vs. *C. albicans* in Staib medium.

orf19 ID	Name ^a	Dub ID	Relative Expression (log2fold) ^b	
			<i>C. albicans nrg1Δ</i> vs. <i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i> vs. <i>C. albicans</i>
orf19.3512	CSP1	CD36_30750	9.60	17.20
orf19.654		CD36_30570	9.50	17.90
orf19.4170	CSP2	CD36_40770	8.47	12.31
orf19.4463		CD36_03620	8.38	13.47
orf19.2317		CD36_10300	7.13	9.93
orf19.6315		CD36_30140	6.49	8.29
orf19.6420	PGA13	CD36_34100	6.47	6.93
orf19.2638		CD36_53200	6.44	9.25
orf19.4011		CD36_54780	6.20	10.82
orf19.2583		CD36_26850	5.61	5.83
orf19.6741		CD36_87380	5.35	8.82
orf19.207	PGA55	CD36_23160	4.84	6.93
orf19.3330.3	POX18	CD36_01320	4.34	7.04
orf19.3885		CD36_31810	3.93	7.48
orf19.4688	DAG7	CD36_41020	3.70	4.58
orf19.2457		CD36_05580	3.44	4.83
orf19.4783		CD36_08720	2.96	5.74
orf19.6569		CD36_71400	2.84	5.21
orf19.4264		CD36_52290	2.84	5.03
orf19.4459		CD36_03600	2.74	5.16
orf19.6920		CD36_71220	2.64	4.82
orf19.2506		CD36_80940	2.48	4.55
orf19.4953		CD36_12310	2.36	4.94
orf19.6788		CD36_87050	2.07	4.49
orf19.5645	MET15	CD36_40270	1.92	5.28
orf19.508	QDR1	CD36_29520	-6.43	-6.32
orf19.4773	AOX2	CD36_08630	-6.03	-6.19
orf19.7150	NRG1	CD36_73890	-4.37	-4.98
orf19.7554		CD36_34960	-3.21	-5.31
orf19.1189		CD36_60240	-2.49	-5.49
orf19.2251	AAH1	CD36_21260	-1.78	-4.55
orf19.1193	GNP1	CD36_60280	-1.75	-4.99
orf19.4555	ALS4	CD36_64610	-1.63	-10.47

^aDenominations CSP1 and CSP2 were proposed in the present study.

^bDownregulation of genes is indicated by a minus (-), followed by the logarithmised log fold change value.
doi:10.1371/journal.pone.0061940.t002

albicans (Table 2; Table S2) [34,35]. Notably, it has been reported that a differential expression of the *UME6* gene contributes to the varied ability of *C. albicans* and *C. dubliniensis* to form filaments [36]. Confirming prior results on *NRG1* expression during chlamydospore development [12], we found the gene to be strongly downregulated in *C. dubliniensis* versus the *C. albicans* wild-type strain during growth in Staib medium (Table 2, Table S2).

Analysis of RNAseq data did not detect a particular differential induction of genes that have previously been identified by mutant screening to be important for efficient chlamydospore formation in *C. albicans*, such as *ISW2*, *MDS3*, *RIM13*, *RIM101*, *SCH9* and *SUV3* [14]. Supporting former findings on the role of the stress-activated protein kinase Hog1 for chlamydospore production in *C. albicans*, *HOG1* transcription was detected in our experiments to be elevated in *C. dubliniensis* and the *C. albicans nrg1Δ* mutant,

suggesting that the cells grown under these conditions may be experiencing osmotic or nutritional stress.

Other genes of interest which were strongly upregulated during chlamydospore development in our assay were those which by differential expression patterns were previously detected during switching or mating in *C. albicans*. For example, expression of *orf19.2317* and *DAG7* was shown to be inducible by alpha-pheromone [37], and *orf19.2506* was reported to be opaque cell specific [38]. In addition, one of the most strongly downregulated genes associated with chlamydospore development was *QDR1/CD36_29520*. This gene, which encodes a putative transporter, was previously detected in *C. albicans* to also experience strong differential expression in white versus opaque cells [39]. The discovery of mating in *C. albicans* has revealed that the life cycle of this microorganism is more complex than originally assumed. In

this context, the interest in chlamydospore development should also be restimulated.

Sequence specificity of the four genes which were most strongly upregulated during chlamydospore formation

Intriguingly, the four most strongly upregulated *C. albicans* genes and *C. dubliniensis* homologues, respectively, encode putative cell wall proteins which display considerable similarity (Table 3) (<http://old.genedb.org/genedb/cdubliniensis/>; <http://www.candidagenome.org/>). Given their chlamydospore related expression and the fact that only these two *Candida* species form chlamydospores, we asked whether these genes are specific for *C. dubliniensis* and *C. albicans* in the genus *Candida*. The Candida Gene Order Browser (GCOB) is an online tool for visualising the syntenic context of genes from multiple *Candida* genomes ([http://cgob.ucd.ie](http://cgob.ucd.ie;); [40]). Among 14 species included in GCOB, *caCSP1* (*of19.3512*) and *of19.654* related genes were only found in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. In case of *C. albicans caCSP2* (*of19.4170*), a homologue was in addition to *C. dubliniensis* also detected in *C. tropicalis* (*CTRG_01767*). A comparison of *C. albicans caCSP2* and *C. tropicalis CTRG_01767* on the level of the deduced proteins revealed identity/similarity of 38.9/47.7%, whereas the proteins encoded by *caCSP2* and *cdCSP2* showed identity/similarity of 83.8/86.7% (Table 3). Whether the identified *C. tropicalis* gene encodes a functional homologue of *CSP2* is questionable, especially since *C. tropicalis* is not known to produce chlamydospores. In the case of *of19.4463*, which was absent from the other inspected *Candida* species, the homologue gene *CD36_03620* in *C. dubliniensis* is annotated as a pseudogene which contains several stop codons. The deduced proteins encoded by *of19.4463* and *CD36_03620* displayed identity/similarity of 30.6/38.3% (Table 3), but the genes showed 59.6% identity on the level of DNA. Overall, the application of GCOB uncovered that the identified, putative chlamydospore related *C. albicans* and *C. dubliniensis* genes are not widely distributed in the genus *Candida*. This observation further underlines a putative specific role of these factors during chlamydospore development in *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

Expression of *ca/cdCSP1* and *ca/cdCSP2* is specifically correlated with chlamydospore development

In search of chlamydospore specific markers two pairs of *C. albicans* and *C. dubliniensis* homologues were selected from our identified set of chlamydospore development related genes for detailed analysis, i.e. *cdCSP1/caCSP1* and *cdCSP2/caCSP2*. According to the *C. dubliniensis* genome database, these genes putatively encode cell wall associated proteins (<http://old.genedb.org/genedb/cdubliniensis/>). A comparison of the deduced amino acid sequences revealed that homologues *cdCSP1* and *caCSP1* display 80.1/83.2% identity/similarity. Homologues *cdCSP2* and *caCSP2* are identical/similar to 83.8/86.7% (Table 3). The expression of these highly upregulated, putative chlamydospore related *C. dubliniensis* and *C. albicans* genes was confirmed by qRT-PCR analysis (Figure 3). The results show that *cdCSP1* and *cdCSP2* were upregulated >1000-fold in *C. dubliniensis* during growth in Staib medium in comparison to growth in YPD medium. In accordance, expression levels of the *C. albicans* homologues *caCSP1* and *caCSP2* were higher in the *C. albicans nrg1Δ* mutant than in the *C. albicans* wild type during growth in Staib versus YPD medium. These observations made the two selected *C. albicans* and *C. dubliniensis* genes promising candidates for chlamydospore specific markers.

Localization of chlamydospore specific markers in *C. dubliniensis* and *C. albicans*

The putative chlamydospore related expression of the *C. dubliniensis* genes *cdCSP1* and *cdCSP2* was next analysed in the context of morphologic development. In order to define the expression on a cellular level and the morphotype specific localization of the encoded proteins, DNA cassettes for translational fusions with the green fluorescent protein (GFP) were constructed and integrated into one of the corresponding alleles of the *C. dubliniensis* wild type Wü284 (Figure S1 and data not shown). Cells of the wild type and resulting reporter strains Cd30750G1A/B (for *cdCSP1*) and Cd40770G1A/B (for *cdCSP2*) were grown in Staib medium for 28 h and inspected by fluorescence microscopy. Growth in YPD medium was used as a control. As demonstrated in Figure 4, the analysed proteins were not only specifically and highly abundant in *C. dubliniensis* cells grown in Staib medium, but were exclusively expressed and located in chlamydospores. In these entities, fluorescence was most intensive at the cell surface, thus supporting the putative function of *cdCsp1* and *cdCsp2* as cell wall proteins. Localization of *cdCsp1/2* to chlamydospore cell walls was further supported by a surface plot analysis, shown as example for *cdCsp1* (Figure S3). Expression of these proteins was not detected in yeast cells or pseudohyphae. Most notably, fluorescence was even not detected in suspensor cells, which carry chlamydospores at their terminal ends and presumably share a continuous outer layer with them [41]. In order to find out whether the identified proteins *cdCsp1* and *cdCsp2* are also specifically expressed in *C. dubliniensis* chlamydospores induced by conditions different from Staib medium, the reporter strains were also monitored during growth on rice-extract agar. Like in Staib medium, the investigated gene products were found to be specifically localized to chlamydospores (Figure 4). *C. dubliniensis* wild-type cells grown in YPD as well as under the tested chlamydospore inducing conditions were used as negative controls in order to exclude unspecific autofluorescence.

Next, we investigated whether the identified chlamydospore related factors are also specifically expressed in *C. albicans* chlamydospores. For this purpose, GFP reporter fusions with the homologous *C. albicans* genes *caCSP1* and *caCSP2*, respectively, were constructed and integrated into the genome of the wild type SC5314 at the corresponding loci (Figure S1 and data not shown). The wild type and the resulting reporter strains Ca3512G1A/B (for *caCSP1*) and Ca4170G1A/B (for *caCSP2*) were grown on rice-extract agar and inspected by fluorescence microscopy. Like in *C. dubliniensis*, the monitored *C. albicans* proteins were also specifically expressed and localized in chlamydospores (Figure 5). This finding supported the notion that the proteins encoded by genes *ca/cdCSP1* and *ca/cdCSP2* are the first identified, strictly chlamydospore related factors in *Candida*. Moreover, these proteins appear to be useful as markers for these morphological entities, and the constructed GFP reporter may be useful tools for future research.

Analysis of *C. dubliniensis* mutants in *cdCSP1* and *cdCSP2*

Since the function of chlamydospores is unknown, we were not able to investigate the role of the identified chlamydospore specific proteins. Nevertheless, in case of *C. dubliniensis*, we tested whether the two analysed genes *cdCSP1* and *cdCSP2* are required for efficient chlamydospore development. Deletion mutants Cd30750M4A/B (*cdCsp1Δ*) and Cd40770M4A/B (*cdCsp2Δ*) were constructed in the wild-type strain Wü284 by use of the SAT1-flipper technology (Figure S2). An altered ability of these mutants to produce chlamydospores in Staib medium was not observed (Figure S4). No difference to the wild type was also detected when these mutants were assayed for germ tube formation in cell culture

Table 3. Protein sequence identity/similarity among gene products encoded by the four genes most strongly upregulated during chlamydospore formation.

<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	% identity/similarity	% identity (DNA) ^a
caCSP1	cdCSP1	80.1/83.2	78.3
orf19.654	CD36_30570	80.2/89.2	84.1
caCSP2	cdCSP2	83.8/86.7	82.0
orf19.4463	CD36_03620	30.6/38.3	59.6
		caCSP1 ^b	orf19.654
caCSP1			47.5
orf19.654		58.3	
caCSP2		60.2	67.9
orf19.4463		48.2	72.2
		caCSP2	orf19.4463
caCSP1		55.8	36.8
orf19.654		56.0	65.7
caCSP2			51.4
orf19.4463		64.4	
		cdCSP1	CD36_30570
cdCSP1		42.6	59.0
CD36_30570		56.6	60.4
cdCSP2		64.5	76.0
CD36_03620		38.0	47.4
		cdCSP2	CD36_03620
cdCSP1		59.0	26.7
CD36_30570		60.4	40.5
cdCSP2		76.0	29.0
CD36_03620		47.4	37.2

^aPer cent identity of the *C. albicans* and *C. dubliniensis* homologues on the level of DNA.

^bPer cent similarity (lower left) and identity (upper right) among the gene products is given.
doi:10.1371/journal.pone.0061940.t003

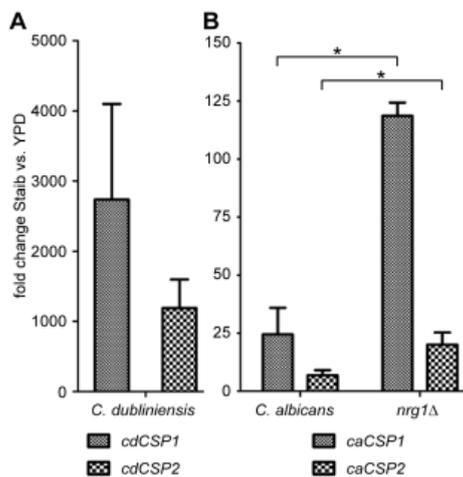


Figure 3. Induced expression levels of genes *CSP1* and *CSP2* during chlamydospore formation. *C. dubliniensis* Wü284, *C. albicans* SC5314 and the *C. albicans nrg1Δ* mutant were grown for 28 h in Staib medium and YPD medium, respectively, before total RNA was isolated. (A) qRT-PCR measurements detected a strong upregulation of *cdCSP1* and *cdCSP2* gene expression levels in *C. dubliniensis* during growth in Staib versus YPD medium. (B) Similarly, the *C. albicans* homologues *caCSP1* and *caCSP2* were found to be upregulated in the chlamydospore producing *C. albicans nrg1Δ* mutant stronger than in *C. albicans* wild-type yeast cells. The results are the means \pm SD from three biological replicates, * indicates that the detected differences were significant ($P < 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0061940.g003

medium or when growth sensitivity was tested in the presence of calcofluor white, congo red, menadion or hydrogen peroxide (data not shown). However, as indicated above (Table 3), the chlamydospore specific genes *cdCSP1*, *CD36_30570*, *cdCSP2* and *CD36_03620* display a high degree of similarity. Therefore, redundant functions of the encoded proteins during chlamydospore assembly can not be excluded, thereby masking a potential phenotype of the single knock-out mutants in either *cdCSP1* or *cdCSP2*. Future construction and phenotypic analyses of multiple knock-out strains in all these related genes would allow further insights in their potential structural functions. Moreover, mutants in the identified chlamydospore specific genes may further be investigated once a functional role of chlamydospores is known.

Conclusion

To date, it remains obscure whether the ability to produce chlamydospores has any impact on the basic life cycle or the adaptation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* to their human host. Interestingly, however, especially these two pathogenic *Candida* species, which are usually not found in the environment [2,16], can form these mysterious morphological structures. In order to get novel insights into the biological role of chlamydospores, the molecular analysis of their development and structural assembly appears therefore to be of particular interest. In the present study, we addressed this issue by the identification of genes which encode chlamydospore specific factors. We took advantage of the observation that *C. albicans* and *C. dubliniensis* display a species specific difference in the regulation of chlamydospore formation in response to environmental growth conditions, i.e. by incubation in Staib medium [18]. The knowledge that species specific chlamydospore production under these conditions is controlled by the differential expression of the transcriptional repressor Nrg1 further supported the identification of chlamydospore specific genes. In general, the identification of chlamydospore associated factors may be difficult, given the observation that chlamydospore production is usually correlated with pseudohyphae formation –

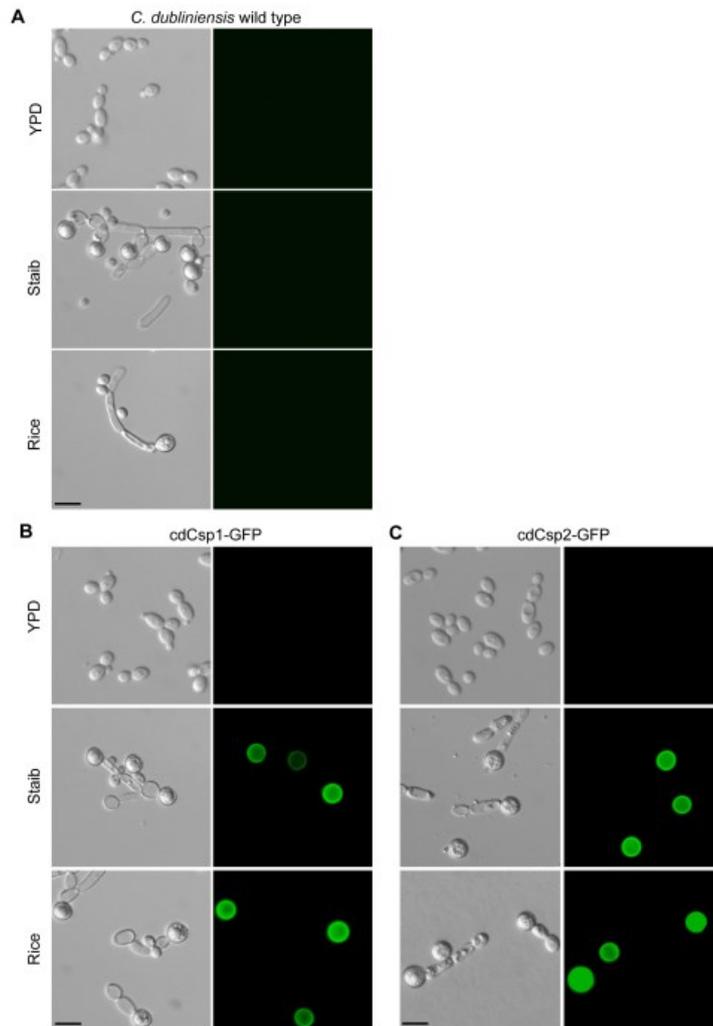


Figure 4. Proteins encoded by *cdCSP1* and *cdCSP2* are specifically expressed and located in chlamydospores. *C. dubliniensis* wild type Wü284 (A) and the *C. dubliniensis* GFP reporter strains Cd30750G1A/B (*cdCsp1-GFP*) (B) and Cd40770G1A/B (*cdCsp2-GFP*) (C) were grown in YPD and Staib liquid medium for 28 h at 25°C, and on rice-extract agar for 3 d at 25°C, respectively, and inspected by phase contrast and fluorescence microscopy. Fluorescence microscopy demonstrated that the genes of interest are specifically induced during growth in Staib medium and that the encoded proteins exclusively localize to chlamydospores. The two independently constructed A/B-GFP reporter strains behaved identically and only one of them is shown (scale bar: 10 µm).
doi:10.1371/journal.pone.0061940.g004

although it is not clear whether these two phenotypes depend on each other or represent independent, co-regulated pathways. In this context, the discovered chlamydospore specific proteins, together with the provided GFP reporter constructs will further help elucidating the genetic control of chlamydospore related gene expression in *Candida*.

In general, knowledge of the identified 'chlamydospore-specific' markers may have particular practical value for chlamydospore identification as well as for further detailed studies on chlamydospore formation, maintenance and germination. Future studies on supposed 'chlamydospore specific' markers will elucidate whether such factors participate in additional processes as well, for example

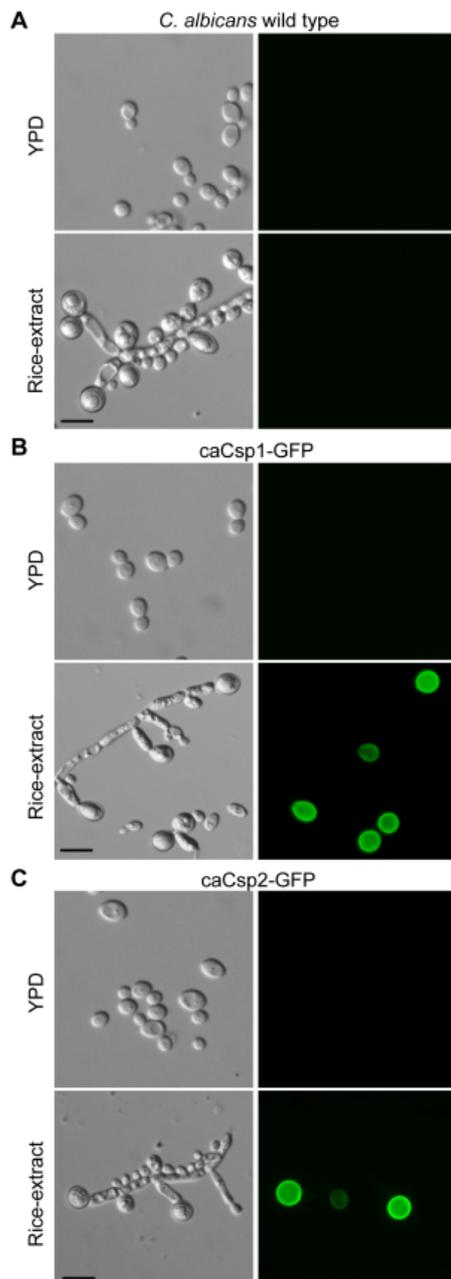


Figure 5. Proteins encoded by *C. albicans* *caCSP1* and *caCSP2* are specifically expressed and located in chlamydospores. *C. albicans* wild type SC5314 (A) and the *C. albicans* GFP reporter strains Ca3512G1A/B (*caCsp1*-GFP) (B) and Ca4170G1A/B (*caCsp2*-GFP) (C) were grown in YPD medium for 28 h at 25°C and on rice-extract agar for 3 d at 25°C, respectively, before the fungal cells were inspected by phase contrast and fluorescence microscopy. Note that the monitored proteins exclusively localize to chlamydospores. The two independently constructed A/B-GFP reporter strains behaved identically and only one of them is shown (scale bar: 10 µm). doi:10.1371/journal.pone.0061940.g005

during host adaptation or mating. If chlamydospores played no role in the life cycle of *C. albicans* and *C. dubliniensis* one would have expected either or both species to have lost the capability to synthesise them. However, since these related pathogenic species are the only yeasts to have been observed to produce chlamydospores it remains to be seen how these fungi benefit from this phenotype. Pursuing research on chlamydospores may not only identify a role for these intriguing cells, but may also help clarify the complete life cycle of *C. albicans* and solve the riddle, why *C. albicans* has not lost the ability to form these striking cellular structures during evolution.

Supporting Information

Figure S1 Construction of GFP reporter strains. (A) The structure of the insert of plasmid pCd30750G2 containing the *CD36_30750*(*cdCSP1*)-GFP reporter fusion is shown on top. At the bottom, the genomic structure of the *CD36_30750* locus in strain Wü284 is shown. The *CD36_30750* coding region is represented by the white arrow, the upstream and downstream regions by solid lines. The *GFP* gene, which is fused to the last codon (before the stop codon) of *CD36_30750*, is symbolized by the hatched arrow. The *caSAT1* selection marker is marked by a grey arrow. Probes for Southern analysis of transformants are indicated by black bars. Restriction sites used to obtain the linear fragment and for Southern analysis are: A, *Apa*I; SI, *Sall*; Scl, *Sac*I. (B) Southern hybridization of *Sall*-digested genomic DNA of parental strain *C. dubliniensis* Wü284 (lane 1) and GFP reporter strains Cd30750G1A (lane 1) and Cd30750G1B (lane 2) with the *CD36_30750*-specific probe 1. The sizes of the hybridizing fragments (in kilobases) are given on the left side of the blot, their identities on the right. (C) Southern hybridization of *Xba*I-digested genomic DNA of parental strain *C. albicans* SC5314 (lane 1) and the GFP reporter strains Ca3512G1A (lane 2) and Ca3512G1B (lane 3) with the *orf19.3512*-specific probe 1. A restriction site polymorphism allows the differentiation of the two homologous wild-type alleles. Reporter strains Ca3512G1A/B containing the *orf19.3512*(*caCSP1*)-GFP fusion were constructed in the same way as the *C. dubliniensis* GFP-reporter strains. (TIF)

Figure S2 Construction of *C. dubliniensis* knock-out mutants in *cdCSP1* (*CD36_30750*) and *cdCSP2* (*CD36_40770*), respectively. (A) Structure of the deletion cassette from plasmid pCd30750M2 (top), which was used for deletion of both *CD36_30750* alleles, and genomic structure of the *CD36_30750* locus in strain Wü284 (bottom). The *CD36_30750* coding region is represented by the white arrow, the upstream and downstream regions by the solid lines. The *SAT1* flipper cassette is represented by a grey rectangle bordered by *FRT* sites (black arrows). The 34-bp *FRT* sites are not drawn to scale. The probes which were used for Southern analysis of the transformants are indicated by the black bars. Restriction sites used to cut out the linear fragment from the plasmid and for Southern analysis are

given: A, ApaI; SI, Sall; ScI, SacI. (B) Southern hybridization of Sall-digested genomic DNA of parental strain Wü284 (lane 1), heterozygous *CD36_30750Δ* mutants Cd30750M2A (lane 2) and Cd30750M2B (lane 3), homozygous *CD36_30750Δ* mutants Cd30750M4A (lane 4) and Cd30750M4B (lane 5) with the *CD36_30750*-specific probe 1. The sizes of the hybridizing fragments (in kilobases) are given on the left side of the blot, and their identities on the right. (C) Southern hybridization of EcoRV-digested genomic DNA of parental strain Wü284 (lane 1), heterozygous *CD36_40770Δ* mutants Cd40770M2A (lane 2) and Cd40770M2B (lane 3), homozygous *CD36_40770Δ* mutants Cd40770M4A (lane 4) and Cd40770M4B (lane 5) with the *CD36_40770*-specific probe 1. The sizes of the hybridizing fragments are given on the left side of the blot, and their identities on the right.

(TIF)

Figure S3 Protein localization of cdCsp1-GFP in chlamydo-spores. Fluorescence microscopy pictures of *C. dubliniensis* chlamydo-spores of strain Cd30750G1A after growth for 3 d at 25°C on rice-extract agar were analysed by surface plot analysis to localize the fluorescence signal of cdCsp1-GFP. (A) The yellow rectangle marks the area for the surface plot analysis. The intensity of fluorescence signal of cdCsp1-GFP within the defined region was determined by plot analysis (not shown) and surface plot analysis (B). The highest brightness was detected within the outer layer of the chlamydo-spore, suggesting that cdCsp1 is particularly located within the chlamydo-spore cell wall.

(TIF)

Figure S4 Phenotypic analysis of *C. dubliniensis* knock-out mutants in genes *cdCSP1* and *cdCSP2*, respectively.

References

- Pfaller MA, Dickema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, et al. (2001) International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* 39: 3254–3259.
- Odds FC (1988) *Candida* and Candidosis: A Review and Bibliography. London: Baillière Tindall.
- Bernhardt E (1946) Time saving in the preparation of corn meal agar and in the identification of yeast-like fungi. *Mycologia* 38: 228–229.
- Kreger-van Rij NJW (1984) The yeasts, a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.
- Staub P, Morschhäuser J (2007) Chlamydo-spore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50: 1–12.
- Taschjian CL (1953) A simple prepared identification medium for *Candida albicans*. *Mycologia* 45: 474–475.
- Citilalo F, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ (2009) Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydo-spores cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res* 9: 1051–1060.
- Chahasse D, Bouchara JP, de Gentile L, Chenebault JM (1988) *Candida albicans* chlamydo-spores observed in vivo in a patient with AIDS. *Ann Biol Clin* 46: 817–818.
- Cole GT, Seshan KR, Phaneuf M, Lynn KT (1991) Chlamydo-spore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol* 37: 637–646.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negrodo AI, Eisman B, et al. (2003) The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydo-spore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2: 351–361.
- Sonneborn A, Bockmuhl DP, Ernst JF (1999) Chlamydo-spore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67: 5514–5517.
- Staub P, Morschhäuser J (2005) Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamydo-spore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol* 55: 637–652.
- Melo NR, Moran GP, Warilow AG, Dudley E, Smith SN, et al. (2008) CYP56 (Dit2p) in *Candida albicans*: characterization and investigation of its role in growth and antifungal drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3718–3724.
- Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP (2003) Genetic control of chlamydo-spore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 149: 3629–3637.
- Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, et al. (2009) Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res* 19: 2231–2244.
- Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, et al. (2004) Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 4: 369–376.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC (1995) *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141: 1507–1521.
- Staub P, Morschhäuser J (1999) Chlamydo-spore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42: 521–524.
- Braun BR, Kadosh D, Johnson AD (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J* 20: 4753–4761.
- Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, Macaskill S, et al. (2001) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* 20: 4742–4752.
- Staub F, Arasteh K (2001) Chlamydo-spore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* 44: 23–27.
- Staub F, Seibold M, Antweiler E, Fröhlich B, Weber S, et al. (1987) The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 266: 167–177.
- Reuss O, Vik A, Kolter R, Morschhäuser J (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341: 119–127.
- Köhler GA, White TC, Agabian N (1997) Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* 179: 2331–2338.
- Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff G, Monod M, et al. (1994) Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 32: 1115–1118.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al. (1989) *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

27. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25.
28. Hecker M, Goetsches RH, Engelmann R, Thiesen HJ, Guthke R (2009) Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy. *BMC Bioinformatics* 10: 262.
29. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
30. Staib P, Morschhäuser J (2005) Liquid growth conditions for abundant chlamydospore formation in *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 48: 50–54.
31. De Groot PW, Hellingwerf KJ, Khis FM (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20: 781–796.
32. Geliš S, de Groot PW, Castillo L, Moragues MD, Sentandreu R, et al. (2012) Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. *Fungal Genet Biol* 49: 322–331.
33. Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Marcus D, Marcil A, et al. (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* 13: 3452–3465.
34. Banerjee M, Thompson DS, Lazzell A, Carlisle PL, Pierce C, et al. (2008) UME6, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell* 19: 1354–1365.
35. Zeidler U, Lettner T, Lassnig C, Muller M, Lajko R, et al. (2009) UME6 is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 9: 126–142.
36. O'Connor L, Caplice N, Coleman DC, Sullivan DJ, Moran GP (2010) Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: Is governed by nutrient regulation of UME6 expression. *Eukaryot Cell* 9: 1383–1397.
37. Dignard D, Whitesway M (2006) SST2, a regulator of G-protein signaling for the *Candida albicans* mating response pathway. *Eukaryot Cell* 5: 192–202.
38. Tsong AE, Miller MG, Rainsier RM, Johnson AD (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 115: 389–399.
39. Lan CY, Newport G, Murillo LA, Jones T, Scherer S, et al. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14907–14912.
40. Fitzpatrick DA, O'Gaora P, Byrne KP, Butler G (2010) Analysis of gene evolution and metabolic pathways using the *Candida* Gene Order Browser. *BMC Genomics* 11: 290.
41. Jansons VK, Nickerson WJ (1970) Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 104: 910–921.
42. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (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.
43. Morschhäuser J, Ruhnke M, Michel S, Hacker J (1999) Identification of CARE-2-negative *Candida albicans* isolates as *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42: 29–32.

4.3 Manuskript 3: Regulation der Chlamydosporenbildung

„*Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamydospore Formation” [155]

Bettina Böttcher, Christine Pöllath, Peter Staib, Bernhard Hube and Sascha Brunke

Veröffentlichtes Manuskript (online seit 12.10.2016):

Front. Microbiol. 7:1697. October 2016, doi:10.3389/fmicb.2016.01697.

Inhaltsangabe

Die Bildung von Chlamydosporen ist eines der wichtigsten diagnostischen Unterscheidungsmerkmale der humanpathogenen Hefearten *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Während aber die molekularen Signalnetzwerke der Hyphenbildung in *C. albicans* gut untersucht sind, ist über die Regulation der Chlamydosporenbildung sehr wenig bekannt. Diese Lücke sollte mit dieser Arbeit gefüllt werden.

Durch eine systematische Analyse der Sporulationsbedingungen konnte gezeigt werden, dass die Sporulation als eine Form der Hungerantwort stark vom Nährstoffangebot abhängt. Ein- und Zweifachzucker sowie Pepton wirkten reprimierend, wobei die Chlamydosporulation von *C. albicans* bereits durch niedrigere Nährstoffkonzentrationen inhibiert wurde als der *C. dubliniensis*-Wildtypstamm oder eine *C. albicans nrg1Δ/Δ*-Deletionsmutante. Die systematische Suche nach Regulatoren der Chlamydosporenbildung zeigte das Zusammenwirken zweier Regulationskaskaden, die bereits zentrale Aufgaben während der Filamentierung innehaben: der TOR- und der cAMP-Weg. Sowohl der Tor1-Kinase-Repressor Rapamycin als auch die Deletion von Tor1-Effektorgenen in *C. albicans* unterdrückten die Chlamydosporenbildung, was die Notwendigkeit einer basalen Tor1-Aktivität für die Sporulation zeigte. Auch der Verlust der zentralen Faktoren des cAMP-Signalweges, Ras1 und Cyr1, führten zu einem Chlamydosporendefekt in *C. albicans*, der partiell durch die Zugabe von zusätzlichem cAMP aufgehoben werden konnte. Entgegen früherer Studien [60] wurde die Sporulation durch Licht nur eingeschränkt und nur im *C. albicans*-Wildtyp reprimiert.

In dieser Studie konnten neuartige Umwelt- und genetische Faktoren, die zur Chlamydosporenbildung beitragen, identifiziert und erstmals in einem (vergleichenden) Modell der Regulation der Chlamydosporulation kombiniert werden.

Eigenanteil

Bettina Böttcher hat alle relevanten Experimente geplant und selbst durchgeführt oder diese angeleitet, die Daten ausgewertet und die entsprechenden Hypothesen und Schlussfolgerungen formuliert. Darüber hinaus hat sie das Manuskript geschrieben und die Abbildungen erstellt.

Geschätzter prozentualer Anteil der Autoren

Bettina Böttcher:	70%	Christine Pöllath:	13%
Peter Staib:	2%	Bernhard Hube:	5%
Sascha Brunke:	10%		

Bernhard Hube



Candida species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamyospore Formation

Bettina Böttcher¹, Christine Pöllath^{1,2,3}, Peter Staib⁴, Bernhard Hube^{1,2,5} and Sascha Brunke^{1*}

¹Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Hans-Knöll-Institute, Jena, Germany, ²Institute for Medical Microbiology, Jena University Hospital, Jena, Germany, ³Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, Jena, Germany, ⁴Department of Research and Development, Kneipp GmbH, Würzburg, Germany, ⁵Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Alex Andrianopoulos,
University of Melbourne, Australia

Reviewed by:

Mira Edgerton,
University at Buffalo, USA
Susana Frases,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

*Correspondence:

Sascha Brunke
sascha.brunke@hki-jena.de

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 22 August 2016

Accepted: 12 October 2016

Published: 27 October 2016

Citation:

Böttcher B, Pöllath C, Staib P, Hube B
and Brunke S (2016) *Candida* species
Rewired Hyphae Developmental
Programs for Chlamyospore
Formation. *Front. Microbiol.* 7:1697.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01697

Chlamyospore formation is a characteristic of many fungal species, among them the closely related human-pathogenic dimorphic yeasts *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. Whereas function and regulation of filamentation are well-studied in these species, the basis of chlamyospore formation is mostly unknown. Here, we investigate the contribution of environmental and genetic factors and identified central proteins involved in species-specific regulation of chlamyospore formation. We show that specific nutrient levels strongly impact chlamyospore initiation, with starvation favoring sporulation and elevated levels of saccharides or peptone inhibiting it. Thresholds for these nutritional effects differ between *C. albicans* and *C. dubliniensis*, which explain species-specific chlamyospore formation on certain diagnostic media. A *C. albicans nrg1Δ* mutant phenocopied *C. dubliniensis*, putting Nrg1 regulation at the basis of species-specific chlamyospore formation under various conditions. By screening a series of potential chlamyospore regulators, we identified the TOR and cAMP pathways as crucial for sporulation. As rapamycin treatment blocked chlamyospore formation, a low basal Tor1 activity seems to be essential. In addition, TOR effector pathways play an important role, and loss of the NCR (nitrogen catabolite repression) gene regulators Gat1 and Gln3 reduced chlamyospore formation. A severe reduction was seen for a *C. albicans gcn4Δ* deletion strain, implicating a link between regulation of amino acid biosynthesis and chlamyospore development. On the other hand, deletion of the GTPase gene *RAS1* and the adenylyl cyclase gene *CYR1* caused a defect in chlamyospore formation that was mostly rescued by cAMP supplementation. Thus, cAMP-signaling is a second major pathway to control chlamyospore production. Finally, we confirmed light exposure to have a repressive effect on chlamyospore formation. However, permanent illumination only reduced, but not abolished chlamyospore production of *C. albicans* whereas *C. dubliniensis* sporulation was unaffected. In summary, we describe novel environmental factors which determine chlamyospore formation and propose a first model for the regulatory network of chlamyospore formation by different *Candida* species.

Keywords: *Candida*, morphology, chlamyospores, Tor pathway, starvation, fungal pathogens

INTRODUCTION

Morphological transitions are a defining feature of polymorphic yeasts, including some *Candida* species which are important pathogens of humans. These changes in cell shape can usually be induced by a number of different stimuli, including temperature, pH value changes, oxygen level, and availability of nutrients. Current research on *Candida* morphology focuses mainly on the yeast-to-hypha-transition, a key virulence factor especially of *C. albicans* (Mayer et al., 2013). In comparison, another morphological structure, the chlamydospores—thick-walled, globular structures formed via suspensor cells on hyphal tips—is often neglected and their biological function remain a mystery. However, they are used as a reliable and cheap diagnostic tool (Campanha et al., 2005), as in addition to certain *Candida* species, many different fungi like *Fusarium*, the dermatophytes, or *Cryptococcus* can form chlamydospores. Their appearance on specific media can hence often serve as a first criterion for fungal species identification (Bakerspigel, 1954; Park, 1954; Lin and Heitman, 2005). Within the *Candida* clade, the close relatives *C. albicans* and *C. dubliniensis* are the only known producers of chlamydospores in addition to other morphological forms, such as yeasts, pseudohyphae, and true hyphae (Staib and Morschhäuser, 2007; Moran et al., 2012).

In general, vegetative spores are formed as resting structures by many soil-borne fungi under nutrient-limited conditions. However, in *Candida* the term chlamydospore does not refer to a functional, but rather to a morphological unit: Although *Candida* chlamydospores resemble such spores and are high in lipid droplets for energy supply (Jansons and Nickerson, 1970a), they are not more resistant to heat, starvation, or dryness compared to yeast cells (Cittulo et al., 2009). Nevertheless, early studies reported a correlation between nutrient supply and induction of chlamydospore formation of the fungus (Jansons and Nickerson, 1970b) where glucose, in contrast to nitrogen, had a strong repressive effect (Dujardin et al., 1980b). Typical inducing media on the other hand are rich in complex carbon sources (e.g., corn or rice meal) and frequently contain detergents. Importantly, *C. dubliniensis* has a higher propensity to produce chlamydospores under conditions where *C. albicans* largely remains in yeast form, and many diagnostic media use this characteristic to differentiate between the two species (Staib and Morschhäuser, 1999). Furthermore, under such conditions where *C. albicans* and *C. dubliniensis* form chlamydospores, *C. tropicalis* robustly grows as pseudohyphae without any chlamydospores, *C. parapsilosis* grows as short filaments, and *C. glabrata* as yeasts (Silva et al., 2012). This hints toward a conserved morphogenetic pathway between *C. albicans* and *C. dubliniensis*, which is not present in more distantly related non-*albicans* *Candida* species.

The natural niche for chlamydospore formation remains unknown, and no clear role of chlamydospores for the commensal or pathogenic life style of *Candida* has been demonstrated: Only sporadic studies reported the isolation of chlamydospores from candidemia patients (Chabasse et al., 1988) and some *C. albicans* isolates from clinical specimens were found

to be chlamydospore-negative (Al-Hedaithy and Fotedar, 2002). Thus, a possible involvement of chlamydospores in the infection process is unclear. However, the fact that the ability to form chlamydospores has been conserved in the vast majority of *C. albicans* and *C. dubliniensis* isolates suggests an important biological function for both species. Although the biological function of chlamydospores remains to be uncovered, essential genes required for their formation have been described (Nobile et al., 2003). Some of these genes are part of the stress-responsive HOG and Cek1-mediated MAPK pathways (Sonnenborn et al., 1999; Eisman et al., 2006), while others form a loose network without clear connections to other signal transduction pathways in *Candida* spp. (Nobile et al., 2003).

Fundamental regulatory differences are known for the other morphologies of *C. albicans* and *C. dubliniensis*. In contrast to *C. albicans*, *C. dubliniensis* rarely forms true hyphae, which has been linked to modified hyphae-promoting regulatory pathways, namely the Tor1 and cAMP-PKA cascades (Sullivan and Moran, 2011; Caplice and Moran, 2015). Species-specific thresholds for nutritional signals seem to define the unique gene expression patterns, which are finally controlled by the central transcription factors Nrg1, Efg1, and Ume6 (Moran et al., 2007; O'Connor et al., 2010). Despite few recent studies on the regulation of chlamydospore formation, most research papers dealing with *Candida* chlamydospores were published before the discovery of *C. dubliniensis* in 1995 (Sullivan et al., 1995) and detailed information on *Candida* species-specific factors of chlamydospore formation is largely lacking. Nevertheless, the major hyphae repressor Nrg1 seems to play a key role in the suppression of chlamydospore formation of *C. albicans*. Therefore, Nrg1 is considered one of the most important factors for the species-specific characteristics of yeast-to-hypha transitions (Moran et al., 2007) as well as chlamydospore formation (Staib and Morschhäuser, 2005).

In this study, we re-evaluated the idea of a nutritional control of chlamydospore development, systematically compared *C. albicans*- and *C. dubliniensis*-specific features of chlamydospore induction under a range of conditions, and screened a series of mutants lacking key regulators of morphology in combination with specific inhibitors of regulatory pathways. Based on these data, we propose a model of chlamydospore regulation that combines rewiring of hyphae-specific pathways and chlamydospore- as well as species-specific aspects.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Culture Conditions

Candida strains and mutants are listed in **Table 1** and were routinely propagated on YPD agar (10 g yeast extract, 20 g peptone, 20 g glucose, 15 g agar per liter) at 30°C and stored as frozen stocks in YPD medium with 15% (v/v) glycerol at -80°C.

Strain Constructions

All strains are listed in **Table 1**. The uridine auxotrophic CAI4-based *C. albicans* strains were complemented with *URA3* by integration of a *StuI*-linearized Clp10 vector (Murad et al.,

TABLE 1 | *Candida* strains used in this work.

Strain	Parent	Genotype	References
<i>C. albicans</i> STRAINS			
SC5314		<i>C. albicans</i> wild-type strain	Gillum et al., 1984
RM1000	CA4	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG rps1::URA3 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Negredo et al., 1997
CA4	SC5314	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Fonzi and Irwin, 1993
BWP17	RM1000	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG arg4Δ/arg4Δ</i>	Wilson et al., 1999
DAY286	RM1000	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 pARG4::URA3::arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i>	Davis et al., 2002
THE1	CA4	<i>ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 ENO1/eno1Δ::ENO1-tetR-SoHAP4AD-3xHA-ADE2 ade2Δ::hisG/ade2Δ::ADE2-URA3-971-FLUC1</i>	Nakayama et al., 2000
<i>rng1Δ</i>	CA4	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434 rng1Δ::hisG-URA3-hisG/rng1Δ::hisG</i>	Murad et al., 2001
<i>suw3Δ</i>	BWP17	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434 arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG his1Δ::hisG/his1Δ::hisG suw3Δ::Tn7-UAU1/suw3Δ::Tn7-URA3</i>	Nobile and Mitchell, 2009
<i>sch9Δ</i>	BWP17	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434 arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sch9Δ::Tn7-UAU1/sch9Δ::Tn7-URA3</i>	Nobile and Mitchell, 2009
<i>mds3Δ</i>	BWP17	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434 arg4Δ::hisG/arg4Δ::hisG his1Δ::hisG/his1Δ::hisG mds3Δ::Tn7-UAU1/mds3Δ::Tn7-URA3</i>	Nobile and Mitchell, 2009
<i>rim101Δ</i>	CA4	<i>rim101Δ::hisG/rim101Δ::hisG-URA3-hisG IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Ramon et al., 1999
<i>vps11Δ</i>	BWP17	<i>his1Δ/his1Δ::HIS1 vps11Δ::ARG4/vps11Δ::URA3 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Palmer et al., 2003
<i>dil2Δ</i>	CA4	<i>dil2Δ::HIS1/dil2Δ::URA3 his1Δ/his1Δ ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Arnold Bto, University of Salzburg, Austria
<i>stt4Δ*</i>	RM1000	<i>stt4Δ::HIS1/stt4Δ::dp200 rps1::URA3 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Lee et al., 2004
<i>gcn2Δ*</i>	CA4	<i>gcn2Δ::hisG/gcn2Δ::hisG rps1::URA3 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Tournu et al., 2005
<i>gcn4Δ</i>	CA4	<i>ura3Δ::Δimm434/ura3Δ::Δimm434, gcn4Δ::hisG-URA3-hisG/gcn4Δ::hisG IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Tripathi et al., 2002
<i>gat1Δ</i>	CA4	<i>gat1Δ::hisG/gat1Δ::hisG iro1-ura3Δ::Δimm434/RO1-URA3</i>	Limjindaporn et al., 2003
<i>gth3Δ</i>	CA4	<i>gth3Δ::hisG/gth3Δ::hisG iro1-ura3Δ::Δimm434/RO1-URA3</i>	Liao et al., 2006
<i>cyr1Δ</i>	CA4	<i>cyr1Δ::hisG/cyr1Δ::hisG iro1-ura3Δ::Δimm434/iro1-ura3Δ::Δimm434</i>	Rocha et al., 2001
<i>pde2Δ</i>	SC5314	<i>pde2Δ::FRT/pde2Δ::FRT</i>	Yi et al., 2011
<i>ras1Δ</i>	CA4	<i>ras1Δ::hisG/ras1Δ::hph-URA3-hph IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Feng et al., 1999
<i>ume6Δ</i>	SN87	<i>ume6Δ::Cot-HIS1/ume6Δ::CmlLEU2 IRO1/iro1Δ::Δimm434</i>	Zeidler et al., 2009
<i>UMES^{OE}</i>	THE1	<i>ume6Δ::P_TET_{OFF}-UMES/ume6Δ::FRT</i>	Melanie Polke, Hans-Kröhl-Institut, Jena, Germany
<i>C. dubliniensis</i> STRAIN			
WU284		<i>C. dubliniensis</i> wild-type strain	Morschhäuser et al., 1999

*To restore prototrophy, strains based on CA4 were complemented with URA3 using Clp10.

2000). Transformations were performed following standard procedures (Walther and Wendland, 2003). Briefly, cultures were washed and treated with lithium-acetate solution, the linearized vector was added together with carrier DNA and polyethylene glycol, and the cells were exposed to a 15 min heat shock at 44°C. Uridine-positive transformants were selected on SD agar. Integration at the *RPS1* locus was confirmed by PCR.

Growth Curve Analyses

The effect of rapamycin on cell proliferation was evaluated via growth curve assays. Strains were pre-grown overnight in YPD at 30°C and after repeated washing they were diluted to OD₆₀₀ = 0.01 in YPD with and without supplementation of 5 nM rapamycin (Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Germany) solved in DMSO (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) or an adequate amount of DMSO as control. Cultures were incubated at 30°C in a Magellan TECAN

plate reader (Tecan I-Control Infinite® 200 Pro, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) with the extinction in the wells at 600 nm determined over 48 h every 15 to 30 min after 30 s orbital shaking. Generation times as the time for one doubling of cell count was calculated in phases of exponential growth (Hall et al., 2014). Additionally, the initial time points and the extinction in the wells at 600 nm at the stationary phase were measured.

Chlamydospore Formation

Chlamydospore production was induced on corn meal (CM)-Tween 80 agar (BD, Heidelberg, Germany), rice meal-Tween 80 agar (BD, Heidelberg, Germany), yeast nitrogen base medium (YNB) without ammonium sulfate (MP, Santa Ana, CA, USA) agar, or SLAD agar (YNB without ammonium sulfate, with 2% glucose), each supplemented as indicated. The plates were incubated at 27°C for 7 days in darkness and chlamydospore formation was monitored microscopically (Axiovert, Zeiss,

Göttingen, Germany). For quantification of chlamydospores a score system (chlamydospore index, CI) was introduced with a scale ranging from none (0), intermediate (1–2) to full (3) chlamydospore production (see Supplementary Figure S1 for details).

Inhibition of Chlamydospore Formation

Different substances were tested for their influence on chlamydospore formation. Additional carbon sources (glucose, maltose, lactose, sucrose, galactose, glycerol, and mannitol), ammonium sulfate, peptone, caffeine (Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or heat-inactivated fetal calf serum (Bio&SELL GmbH, Feucht, Germany) were directly added to the liquid agar at 60°C. Dibutyl-*c*-AMP (db-*c*-AMP; Sigma-Aldrich and Merck KGaA, Darmstadt, Germany), rapamycin (solved in DMSO), or DMSO (vehicle control) were distributed on top of solid agar plates to avoid heat-induced degradation. Effects of inhibitors were tested with agar diffusion assays. To this end, an 8 mm diameter hole in the agar plate was filled with liquid test substances. After the liquid was completely soaked into the agar, the *Candida* strains were streaked radially from the agar hole.

Protein Alignment

Protein light sensors (IreA, IreB and VeA) of *Aspergillus nidulans* were aligned to the proteome of *C. albicans* SC5314 and *C. dubliniensis* Wü284 using the PBLAST tool at the *Candida* Genome Database (<http://www.candidagenome.org>).

RESULTS AND DISCUSSION

Nutrient Availability Effects on Chlamydospore Formation Depend on the Species

Nutrient availability controls morphogenesis in a diverse range of fungi. For example, next to mating type, lack of nitrogen or fermentable carbon sources is the most important factor to induce sexual sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* (Mitchell, 1994). Fungal secondary metabolism (Tudzynski, 2014) as well as many pathogenicity pathways (Limjindaporn et al., 2003) are similarly responsive to nitrogen availability. Morphological transitions that are triggered by nitrogen starvation include pseudohyphal growth of diploid *S. cerevisiae* (Gimeno et al., 1992) and the *Gcn4*-dependent filamentation by *C. albicans* (Tripathi et al., 2002). Some impact of nitrogen on chlamydosporulation has also been described for *C. albicans* (Jansons and Nickerson, 1970b; Dujardin et al., 1980b) but no such information is available for *C. dubliniensis* so far. Hence, we tested the effect of nutrient addition to chlamydospore-inducing corn meal tween (CM) agar and rice agar. The results are shown in Table 2 using the chlamydospore index (CI) as a semi-quantitative score system (see Figure S1 for representative micrographs of different scores). Presence of additional 0.5% ammonium sulfate had no effect on the strong chlamydospore formation of both, *C. albicans* and *C. dubliniensis*, on these media (Figure 1A). Addition of a readily available carbon source (2% glucose) specifically inhibited *C. albicans* chlamydosporulation. However, only the presence

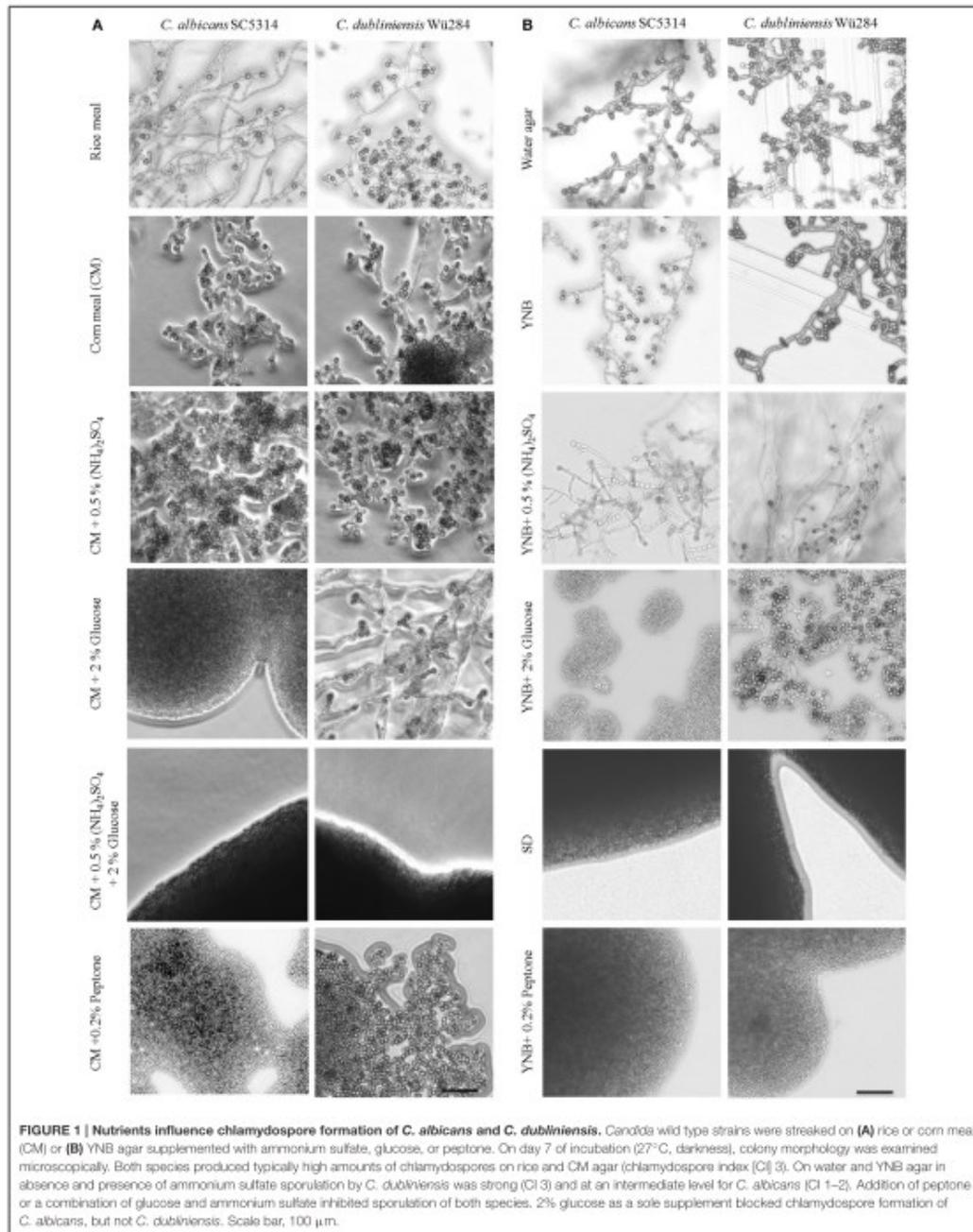
TABLE 2 | Effects of different carbon and nitrogen sources on chlamydospore formation by *C. albicans* SC5314, *C. dubliniensis* Wü284, and *C. albicans nrg1A*.

Agar	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. dubliniensis</i> Wü284	<i>C. albicans nrg1A</i>
Cornmeal (CM)	3	3	3
+ 2% Glucose	0	1	3
+ 0.5% Ammonium sulfate	3	3	3
+ 2% Glucose, 0.5% ammonium sulfate	0	0	0
+ 2% Galactose	0	1.5	2
+ 2% Lactose	3	3	3
+ 2% Sucrose	0	3	3
+ 2% Maltose	0	1	3
+ 2% Mannitol	1	3	3
+ 2% Glycerol	3	3	3
+ 0.2% Peptone	0	2	3
+ 2% Peptone	0	0	1.5
Water agar	2	3	3
Yeast nitrogen base (YNB)	1.5	3	3
+ 2% Glucose (SLAD)	0	3	3
+ 0.5% Ammonium sulfate	1	3	3
+ 2% Glucose, 0.5% ammonium sulfate (BD)	0	0	0
+ 2% Galactose	0	2.5	3
+ 2% Lactose	1	3	3
+ 2% Sucrose	0	3	3
+ 2% Mannitol	0	2.5	3
+ 2% Glycerol	1.5	2	3
+ 0.2% Peptone	0	0	3
+ 2% Peptone	0	0	0

Numbers indicate chlamydospore quantity (CI), with 3 = strong, 1–2 = little to medium, and 0 = no sporulation. See Figure S1 for exemplary micrographs of colony morphologies.

of both, additional carbon and nitrogen sources, reduced chlamydospore formation in *C. dubliniensis*.

To elucidate this effect further, we used defined synthetic media. Pure water agar as a highly nutrient-restricted medium induced chlamydospores in both, *C. albicans* and *C. dubliniensis* [(Jansons and Nickerson, 1970b) and Figure 1B]. This was not visible on standard, N- and C-source containing SD agar, suggesting that nutrient supplementation inhibits sporulation. In order to distinguish between nitrogen-, carbon-, and other nutrient-responsive effects, a minimal medium—yeast nitrogen base (YNB)—was used to provide only essential trace metals, vitamins, and minerals. This medium readily induced chlamydospores in both species (Figure 1B), and we thus excluded a major sporulation effect by the presence of micronutrients alone. The addition of 2% glucose to YNB (a medium equal to SLAD agar) blocked chlamydospore formation again specifically in *C. albicans*. Interestingly, SLAD agar is a medium well-known to induce hyphae-like and invasive growth in both, *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Cutler et al., 2001; Laxman and Tu, 2011), which may indicate an evolutionary



connection between pseudohypha and chlamydospore formation pathways. YNB agar supplementation with 0.5% ammonium sulfate dramatically reduced, but did not abolish sporulation by *C. albicans*. Similar to CM agar, only a combination of nitrogen and carbon sources inhibited sporulation of *C. dubliniensis*, while addition of a single macronutrient had little or no inhibiting effect.

In contrast to ammonium, the addition of even low concentrations of peptone as an organic nitrogen source (0.2%) had a strong repressive effect on chlamydospore formation, independent of the *Candida* species (Figure 1B). This observation indicates a crucial role of amino acid presence and catabolism rather than just total nitrogen content on sporulation. Previous transcriptome analysis under chlamydospore-inducing conditions showed a significant up-regulation of peptide starvation response genes, e.g., the oligopeptide transporter gene *PTR2* (Palige et al., 2013). *Ptr2* is a conserved high-affinity transporter which was shown to physically interact with the nutrient-sensing Tor1 and Tor2 complexes in *S. cerevisiae* (Aronova et al., 2007). This *Ptr2* up-regulation and the inhibitory effect of peptone thus indicate that sensing of peptide starvation is a major chlamydospore-inducing factor. However, in CM agar, peptone inhibited chlamydospores only in *C. albicans*. Therefore, in comparison to YNB agar, CM agar seems to be a generally stronger trigger of chlamydospore formation, able to induce robust sporulation by both *Candida* species and showing less inhibition by the presence of nutrients for *C. dubliniensis*.

Another species-specific repressing role of peptone, here on filamentation, has been described earlier: In the presence of peptone, *UME6* gene expression is low in *C. dubliniensis*, but high in *C. albicans*, allowing hyphae formation only by the latter (O'Connor et al., 2010). Artificial overexpression of *UME6* consequently enables filamentation of *C. dubliniensis*. Interestingly, *Ume6* interacts with the chromatin remodeling complex *Isw2* in *S. cerevisiae* to repress expression of meiotic genes (Goldmark et al., 2000) and a *C. albicans isw2Δ* mutant fails to form chlamydospores (Nobile et al., 2003). Hence, we tested sporulation of a *C. albicans ume6Δ* deletion as well as a *UME6^{OE}* overexpression strain on standard and peptone-supplemented CM agar. Against our expectation, the *ume6Δ* mutant was not impaired in chlamydosporulation on CM agar, and *UME6* overexpression did not allow chlamydospore formation on peptone- or glucose-containing media, although hyphae were formed readily (Figure S2). In contrast, deletion of the filamentation repressor *NRG1* in *C. albicans* was epistatic to the glucose- or peptone-induced chlamydospore inhibition and its effect could only be reversed by ammonium sulfate or high peptone levels (Table 2). Therefore, we concluded that a strong link between chlamydospore and filamentation regulation exists, but that *UME6* is not a key factor in the former.

Nitrogen-Sensing Pathways Promote Chlamydospore Formation

Eukaryotes sense availability of nutrients like nitrogen and glucose via the highly conserved Tor1 kinase complex. Under conditions of sufficient nutrient supply, Tor1 is active and drives a signal cascade that supports cell proliferation, whereas Tor1

inhibition under starvation mediates autophagy (Kamada et al., 2004) and stimulates nitrogen uptake as well as expression of nitrogen catabolite-repressed genes (Cardenas et al., 1999). We hence supplemented chlamydospore-inducing media with the Tor1 antagonists rapamycin and caffeine to investigate a possible role of Tor1-signaling in sporulation. Sublethal rapamycin (20 nM) and caffeine (5 mM) concentrations allowed sustained growth, but efficiently abolished chlamydospore formation of *C. albicans* on CM agar (Figure 2A). Similarly, chlamydospore formation was also strongly reduced in *C. dubliniensis*, although some sporulation remained (CI 1) even under rapamycin treatment (Figure 2A). To further investigate this inhibition, we next tested the response to rapamycin and caffeine on the *C. dubliniensis*-specific chlamydospore inducer medium, SLAD agar (YNB + 2% glucose). Here both substances totally abolished sporulation (Figure 2B), and therefore rapamycin had an even more severe effect on *C. dubliniensis* than in CM agar-based assays. Similar effects were seen on chlamydospore-inducing niger seed (*Guizotia abyssinica*) agar (Staub and Morschhäuser, 1999) or rice agar (data not shown) which suggests a conserved TOR-related mechanism independent of the specific inducing medium.

How can the nutrient sensor TOR influence fungal morphology on low-nitrogen agar? Under nitrogen starvation, diploid *S. cerevisiae* cells are known to grow as pseudohyphae that invade SLAD agar surfaces (Gimeno et al., 1992), and this morphological transition can be abolished by rapamycin treatment (Cutler et al., 2001). Therefore, it has been suggested that the pseudohyphae of baker's yeast rely on a low, but stable TOR activity during nitrogen starvation (Cutler et al., 2001). According to this model, both the presence of nutrients with its increased TOR activity as well as rapamycin-mediated repression of the TOR pathway can lead to inhibition of filamentation (Cutler et al., 2001). Parallels can be drawn to our observation of a rapamycin-sensitive chlamydospore formation by *Candida* spp., and we thus propose that similar to *S. cerevisiae* pseudohyphae, a limited amount of Tor1 activity is needed to induce chlamydospores. Differences in basal TOR activity levels and distinct thresholds to supplementary nutrients and Tor1 antagonists could thus explain the species-specific response.

Analogous to pseudohyphal growth of *S. cerevisiae*, addition of TOR inhibitors to SLAD agar also blocks hyphal growth of *C. albicans* and pseudohyphal growth of *Candida lusitanae* and *Cryptococcus neoformans* (Cutler et al., 2001). Therefore, it seems that chlamydospore formation relies on conserved morphogenesis pathways that are dependent on the nutritional state sensor TOR, but adapted to drive different growth forms during evolution.

As *C. albicans nrg1Δ* sporulated nearly constitutively even in presence of several good nutrient sources, the mutant strain was similarly treated with rapamycin and caffeine. However, even in the presence of inhibitors chlamydospore formation was not reduced (Figure S3), although the colonies appeared smaller. A likely explanation is that nutrient-driven pathways, including the TOR network, positively control the transcriptional repressor *Nrg1*. In line with this suggestion, gene expression of *NRG1* was shown to be higher in *C. albicans* than *C. dubliniensis* under conditions where chlamydospore formation was observed only

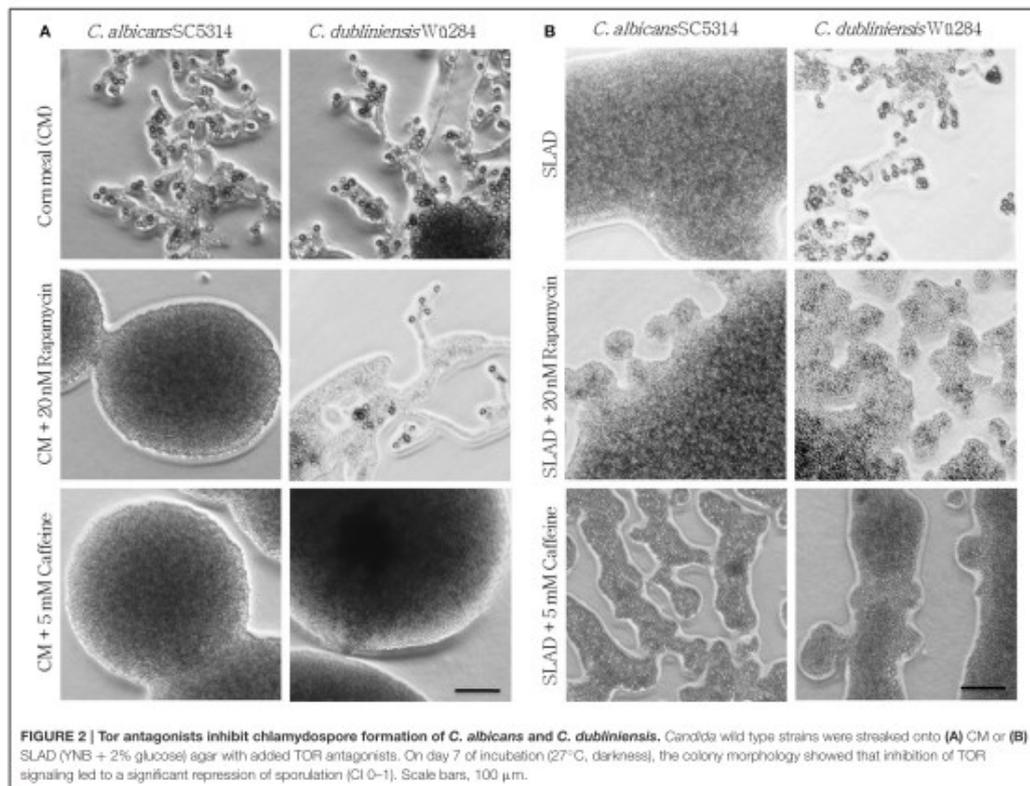


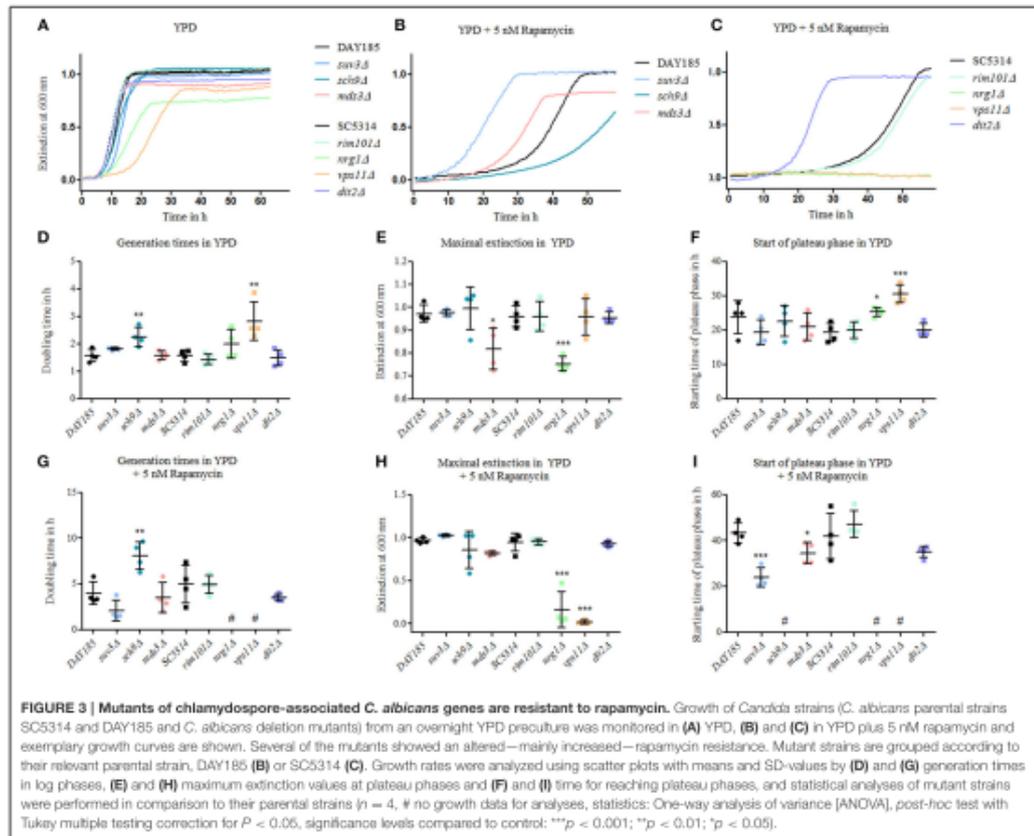
FIGURE 2 | Tor antagonists inhibit chlamydospore formation of *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Candida* wild type strains were streaked onto (A) CM or (B) SLAD (YNB + 2% glucose) agar with added TOR antagonists. On day 7 of incubation (27°C, darkness), the colony morphology showed that inhibition of TOR signaling led to a significant repression of sporulation (CI 0–1). Scale bars, 100 μ m.

in the latter (Staub and Morschhäuser, 2005). In combination with our data, this suggests that a low but stable TOR activity keeps *NRG1* expression at such reduced levels that allow the intense chlamydosporulation of *C. dubliniensis*. Analogous observations have been made during hyphae development, where both, rapamycin treatment and *NRG1* deletion, in *C. dubliniensis* phenocopied *C. albicans*-like filamentation in liquid media (Sullivan and Moran, 2011).

Tor1 Antagonists Directly Impact Chlamydosporulation and Associated Gene Expression

Currently, 19 genes are known to be essential for proper chlamydosporulation in *C. albicans*, among them two genes encoding key components of the TOR regulatory pathway; Sch9 and Mds3 (Sonneborn et al., 1999; Davis et al., 2002; Nobile et al., 2003; Staub and Morschhäuser, 2005; Eisman et al., 2006). To follow up on the connection between TOR signaling and chlamydospore formation, we tested the resistance and growth of known chlamydospore-defective *C. albicans* mutants (*suv3* Δ ,

sch9 Δ , *mds3* Δ , *rim101* Δ , *vps11* Δ , *dit2* Δ) as well as of the hypersporulative *nrg1* Δ mutant, in the presence of rapamycin as altered rapamycin resistance can serve as an indicator for a role in the TOR signaling cascade (Huang et al., 2004). All mutants were viable and most grew at roughly wild-type levels in YPD without drug, with slightly, but significantly prolonged generation times of the *sch9* Δ and *vps11* Δ mutant strains (Figures 3A,D). The *nrg1* Δ and the *mds3* Δ strains showed a more severe reduction in optical density (Figure 3E) due to and in proportion to their hyperfilamentous morphology. Moreover, *nrg1* Δ and *vps11* Δ reached stationary growth phases later than the other strains (Figures 3A,F). In presence of rapamycin, we identified three groups of mutants: The strongly resistant strains *suv3* Δ , *mds3* Δ , and *dit2* Δ with early stationary phases (Figure 3I); the highly susceptible strains *sch9* Δ , *vps11* Δ , and *nrg1* Δ showing significantly increased doubling times or even no growth (Figures 3G–I); and the strain *rim101* Δ , the growth of which was not influenced by rapamycin. These results mirror the key role of TOR signaling during chlamydospore formation, but additional TOR-independent pathways seem to exist, as indicated by the rapamycin-unaaffected mutant lacking



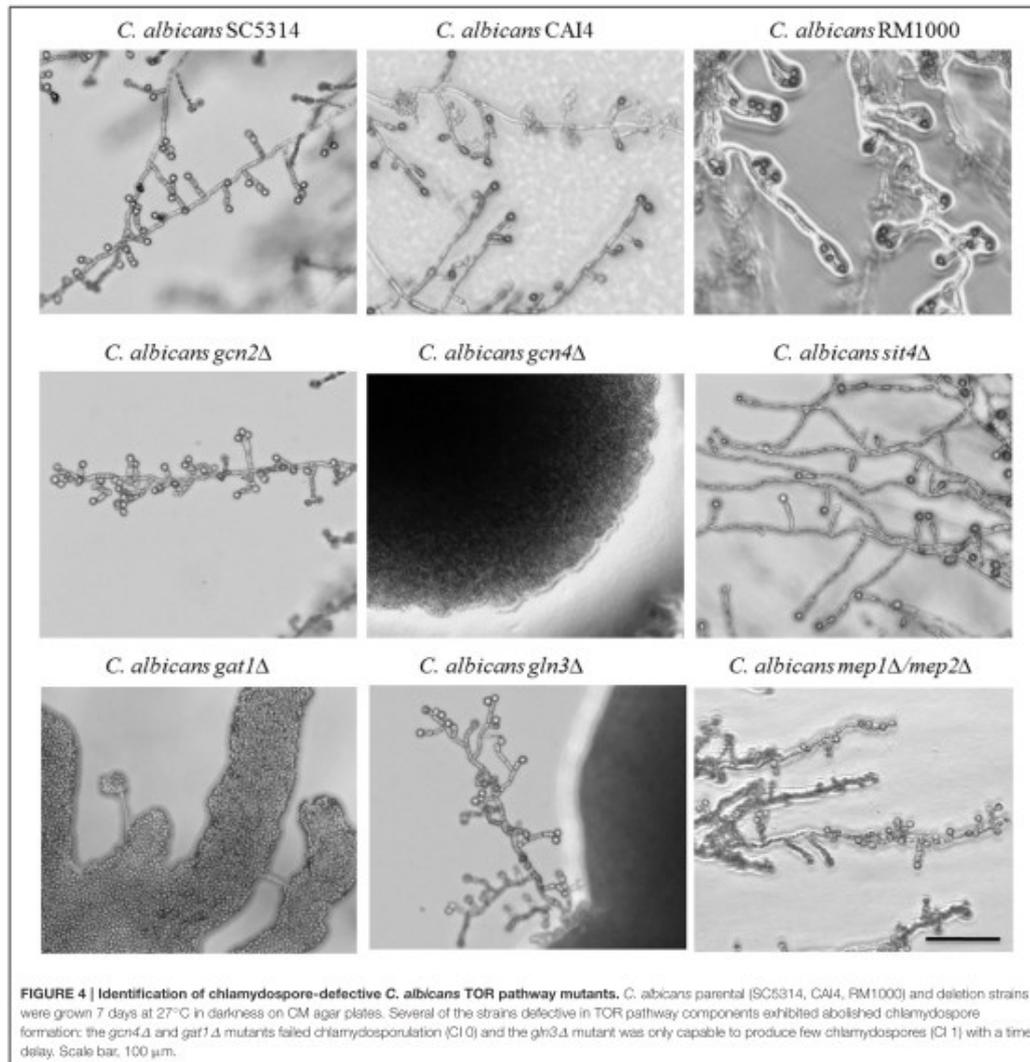
the transcription factor Rim101. A possible explanation may be that chlamydospore-inducing media generally have a slightly acidic pH around 5–6 (Montazeri and Hedrick, 1984), and pH-signaling is mediated by Rim101 and its activator Rim13, both of which are known to be essential for full chlamydosporulation (Nobile et al., 2003).

Key Factors of the Tor Signaling Cascade Are Required in Chlamydospore Production

Our analyses thus showed a connection to TOR signaling, which comprises a complex network that controls growth and longevity in eukaryotes as well as morphology in fungi (Shertz and Cardenas, 2011). In order to better understand the function of this signaling cascade during chlamydospore formation, we went on to screen a selection of *C. albicans* TOR signaling deletion mutants for chlamydospore production on CM agar (Figure 4). A key target of the Tor complex is the Sit4 phosphatase, which

has multiple cellular functions including regulation of cell cycle, cytoskeleton assembly, and rDNA gene expression (Angeles de la Torre-Ruiz et al., 2002). The loss of Sit4 in *S. cerevisiae* results in defective pseudohyphal differentiation (Cutler et al., 2001), and a *C. albicans sit4Δ* mutant is both a filamentous and avirulent (Lee et al., 2004). In contrast, on CM agar a *C. albicans sit4Δ* deletion strain showed no defect in chlamydosporulation (Figure 4), indicating no function of Sit4 during chlamydospore formation, in stark contrast to filamentation.

In the presence of sufficient nutrients, the TOR pathway blocks uptake and catabolism of nitrogenous substrates, but under nitrogen-poor conditions, it facilitates nuclear entry of the GATA factors Gat1 and Gln3 to mediate expression of nitrogen catabolite repressed (NCR) genes (Beck and Hall, 1999). In parallel, TOR represses the expression of amino acid biosynthesis genes under sufficient nutrient availability via the eIF2 α kinase Gcn2 that activates the transcription factor Gcn4. Thus, regulation occurs on transcriptional, translational and post-translational levels (Cherkasova and Hinnebusch,



2003). The role of these two nitrogen-responsive cascades for chlamydospore formation was assayed using *C. albicans* deletion mutants of key factors on CM agar.

Both pathways seem to play an important role during chlamydospore development, because deletion of either the central activator of amino acid biosynthetic genes, Gcn4 (Tripathi et al., 2002), or the transcriptional activator of NCR genes, Gat1 (Limjindaporn et al., 2003), caused chlamydospore deficiency (Figure 4). In fact, the *C. albicans gat1Δ* deletion

mutant is a prime example for distinct chlamydospore and hypha regulation programs, as the chlamydospore defect was independent of its filamentation capacity. In contrast to our results, a previous study on the role of *C. albicans* Gat1 during morphogenesis found no reduction in both, hyphae and chlamydospore formation (Limjindaporn et al., 2003), possibly due to media-specific differences. Overall, a diminished TOR activity and the resultant starvation response thus seem to mediate chlamydospore formation.

The second regulator of NCR gene expression is the transcription factor Gln3, which shares many functions with Gat1 (Liao et al., 2008). Deletion of *GLN3* resulted in a reduced efficiency of chlamydospore formation combined with an extended sporulation initiation. Both GATA factors, Gln3 and Gat1, enable yeasts to selectively utilize preferential nitrogen sources via NCR, a mechanism which is indispensable for fungal pathogens like *Aspergillus fumigatus* and *C. albicans* during infections (Lee et al., 2013). Of about 100 direct NCR target genes we hence chose to investigate the role of the ammonium transporter genes, encoding Mep1 and Mep2, by testing the corresponding mutants for their chlamydosporulation capability. To exclude an effect of the functional redundancy of these transporters, a *C. albicans mep1Δ/mep2Δ* double knockout mutant (Biswas and Morschhäuser, 2005) was used. Sporulation was unimpaired in this mutant, in agreement with the non-repressive effect of additional ammonium in CM agar. Thus, this ammonium-specific pathway seems not to be involved in sensing a chlamydospore-inducing environment. This phenotype stands in an interesting contrast to the impact of the high affinity transporter Mep2 on hyphae formation: The N-terminal region of the transporter is essential for *C. albicans* filamentation on SLAD agar (Biswas and Morschhäuser, 2005).

In contrast to ammonium, amino acid homeostasis is under control of Gcn2, which activates Gcn4—a pathway that is controlled by TOR under amino acid excess (Tournu et al., 2005). Whereas, Gcn4 is known to be essential under amino acid starvation and to have a large impact on yeast-to-hypha transitions in *C. albicans* (Tripathi et al., 2002), Gcn2 has a minor role in filamentation processes and is only involved in N-acetylglucosamine (GlcNAc)-induced hyphae development (Tournu et al., 2005; Kamthan et al., 2012). In our experiments, the deletion of *GCN4*, but not *GCN2*, inhibited chlamydospore formation. This suggests a Gcn2-independent route of Gcn4 activation under our tested conditions. In agreement with our previously observed peptone-induced repression, the amino acid starvation response seems to be a crucial element during chlamydospore development by *C. albicans*.

Fermentable Carbon Sources Specifically Inhibit Chlamydospore Formation by *C. albicans*

Common chlamydospore-inducing media are based on corn or rice and are therefore rich in starch, indicating that polysaccharides have an inducing or at least non-repressing effect on chlamydospore development. Complex carbohydrates are known to influence fungal morphology: In *S. cerevisiae*, starch degradation is associated with the ability to grow invasively and form pseudohyphae (Vivier et al., 1997) and polymeric cyclodextrins were described to induce hyphae by *C. albicans* (Fekete-Forgács et al., 1997). The repressing effect of glucose on chlamydosporulation, in contrast, was described almost half a century ago for *C. albicans* (Jansons and Nickerson, 1970b). Here, we tested a variety of carbon sources supplemented to CM and YBN agars (Table 2 and Figure 5) and analyzed their effect on *C. albicans* and *C. dubliniensis* wild type strains as

well as the *C. albicans nrg1Δ* mutant. A direct correlation of the presence of fermentable mono- and disaccharides (glucose, galactose, maltose, sucrose, and glucose-containing serum) and inhibition of chlamydospore development was evident only for *C. albicans*. Furthermore, glucose is known to be the dialysable germ tube-inducing component in serum (Hudson et al., 2004) and the addition of 2% serum to CM agar similarly blocked chlamydospore formation by *C. albicans*. Hence, both glucose and serum, seem to play opposing roles during hyphae formation on one side and chlamydospore development on the other. In contrast, chlamydospore formation of both, the *C. dubliniensis* wild type strain and the *C. albicans nrg1Δ* mutant, was resistant to the addition of sugars. Similar differences exist in filamentation: Serum alone is not sufficient to induce hyphae by *C. dubliniensis* and additional glucose inhibits hyphae formation to some extent (O'Connor et al., 2010). Together, these results point toward a rewired glucose response under chlamydospore-inducing conditions: Glucose is an important hyphae inducer and chlamydospore repressor of *C. albicans*, whereas the same substrate plays the opposite, albeit less pronounced role in morphogenic transitions of *C. dubliniensis*. Our results with the *C. albicans nrg1Δ* mutant furthermore indicate that the nutrient-induced chlamydospore repression of *C. albicans* is likely due to Nrg1-mediated repression of gene expression. A glucose-driven regulation of Nrg1 has been described in the fungal pathogen *C. neoformans*, where expression of the *NRG1* homolog is controlled in response to carbohydrate availability (Cramer et al., 2006).

Notably, supplementation with non-fermentable carbon sources like glycerol and lactose did not inhibit, but rather enhanced sporulation by *C. albicans* (Figure 5), suggesting that only readily utilizable nutrients can block the chlamydospore formation in response to starvation. We found similar repressing effects by both glucose and peptone for *C. albicans*, but in other fungi saccharides have a significantly higher inhibitory potential than nitrogen sources. A low carbon-nitrogen ratio is, for example, the most important inductor of chlamydospore production in soil-borne *Fusarium* species (Griffin, 1976), where they serve as dormant structures under starvation conditions (Smolinska, 2000).

cAMP Signaling Mediates Activation of Chlamydospore-Associated Transcription Factors

Glucose has a broad range of effects on morphogenetic switches, and, in yeasts, its downstream signaling is mediated mainly via the Ras-cAMP-protein kinase A (PKA) pathway (Feng et al., 1999; Hudson et al., 2004). TOR signaling plays also a minor role in the glucose response (Hardwick et al., 1999). Overlaps exist, e.g., in form of Tor1 effector kinase Sch9 which inhibits PKA activity (Zhang et al., 2011) and as a suppression of TOR deficiency due to constitutive stimulation of the RAS-cAMP pathway in yeast (Schmelzle et al., 2004). Therefore, a reliable association of one nutritional trigger or repressor of chlamydospore formation to a distinct pathway is difficult. We therefore investigated the possible role of the Ras-cAMP-PKA

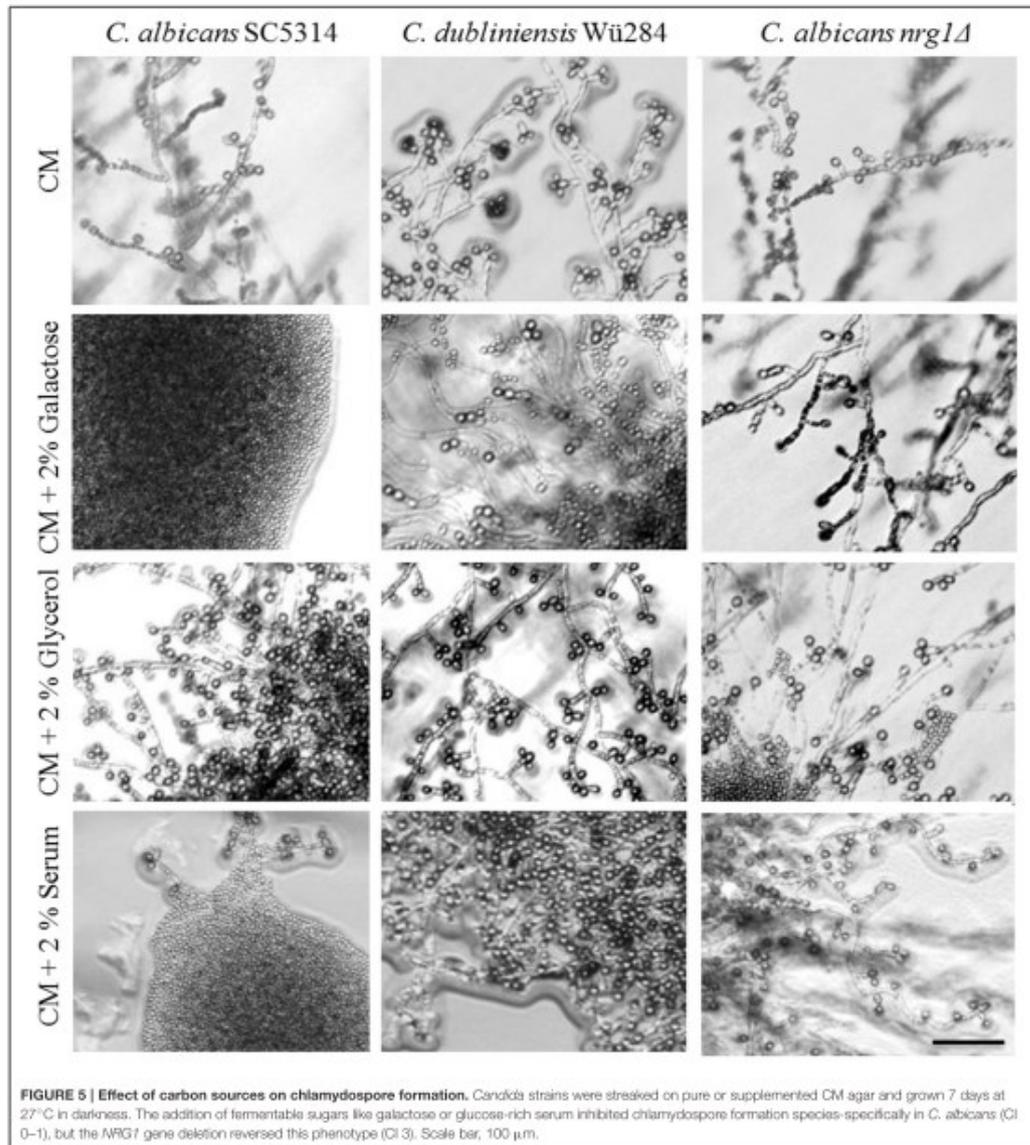


FIGURE 5 | Effect of carbon sources on chlamydospore formation. *Candida* strains were streaked on pure or supplemented CM agar and grown 7 days at 27°C in darkness. The addition of fermentable sugars like galactose or glucose-rich serum inhibited chlamydospore formation species-specifically in *C. albicans* (CI 0–1), but the *NRG1* gene deletion reversed this phenotype (CI 3). Scale bar, 100 μm.

pathway during chlamydosporulation directly. A first link toward cAMP signaling was indicated by a study on the transcriptional activator Efg1. In *C. albicans*, Efg1 acts as a downstream effector of the cAMP-PKA pathway, and an *efg1Δ* deletion mutant exhibited a chlamydosporulation defect (Sonneborn et al., 1999).

We thus systematically investigated more pathway members for their function in chlamydospore formation.

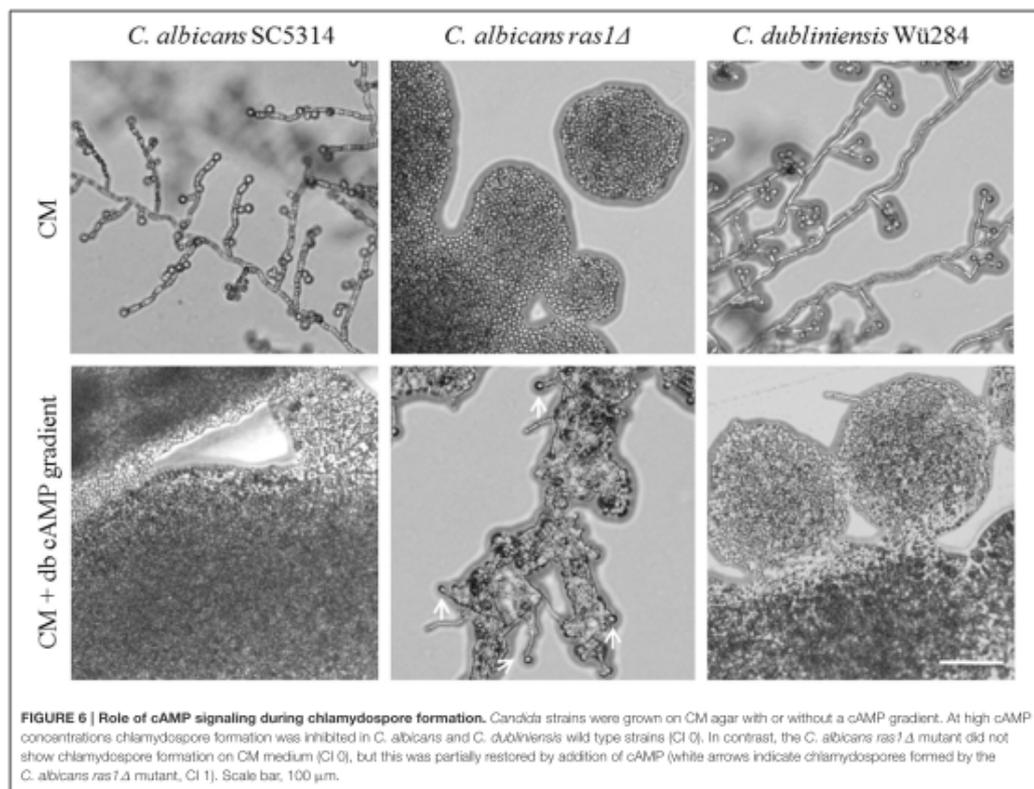
Different environmental stimuli, including hyphae-initiating conditions, activate the Ras1 GTPase. This initiates a cascade by the activation of the Cyr1 adenylyl cyclase, which catalyzes

the formation of cyclic AMP (cAMP) (Rocha et al., 2001). High levels of cAMP in turn activate PKA, which phosphorylates and thus regulates transcription factors like Efg1 (Inglis and Sherlock, 2013). The level of cAMP is tightly regulated in response to external stimuli, and cAMP hydrolysis is driven by the high affinity phosphodiesterase Pde2 (see also Figure 8).

A mutant lacking *RASI* in *C. albicans* lost the ability to form chlamydospores (Figure 6). The *ras1Δ* mutant is also known to be a filamentous on several media, but hyphae formation can be regained by supplementation with cell-permeable dibutyl (db-) cAMP (Rocha et al., 2001). To test its effect on sporulation, we produced CM agar plates with a concentration gradient of db-cAMP by punching a hole into the agar and filling it with a solution of 100 mM db-cAMP. High db-cAMP concentrations fully inhibited sporulation of both *Candida* wild type strains alike. However, at the same concentrations, we identified a zone of increased chlamydospore formation for the *C. albicans ras1Δ* mutant (Figure 6). A similar effect was observed using a *cyr1Δ* mutant (not shown). In further experiments, we found that a concentration of 10 mM db-cAMP in CM agar was sufficient to inhibit chlamydospores formation in the wild type,

but induced sporulation in the *ras1Δ* mutant (data not shown). Moreover, addition of 10 mM db-cAMP inhibited sporulation of *C. dubliniensis* on SLAD agar. Reasoning that, based on the *ras1Δ* phenotype, a certain level of cAMP is required for chlamydospore formation, we tested additional db-cAMP under repressive conditions like nutrient-rich CM agar. However, we were not able to re-induce chlamydospores by *C. albicans* or *C. dubliniensis* (Figure S4).

The intracellular level of cAMP is tightly regulated and the Pde2 phosphodiesterase degrades cAMP (Jung and Stateva, 2003). We thus used a *C. albicans pde2Δ* deletion mutant to investigate the effect of cAMP overload on chlamydospore formation. As expected, on CM agar a *C. albicans pde2Δ* deletion mutant produced significantly more hyphae than the wild type (Jung and Stateva, 2003), but, interestingly, chlamydospore formation was normal (Figure S5). Similarly, it has previously been shown that heterologous expression of *CapDE2* in *C. dubliniensis* reduced filamentation, but did not modify chlamydospore production on the diagnostic niger (*G. abyssinica*) agar (Staib and Morschhäuser, 2005). In contrast to the *nrg1Δ* mutant, *PDE2* deletion did not rescue sporulation in presence of rapamycin or



glucose on CM agar (Figure S5). Therefore, the *C. albicans* *pde2Δ* mutant is another example where hyphae and chlamydospore formations are distinctly regulated.

Active RAS-cAMP signaling was thus shown to be essential to initiate chlamydospores, but no significant species-specific differences were evident. This is reminiscent of the fact that cAMP levels are not at the basis of the characteristically low hyphae formation of *C. dubliniensis*, and that neither a hyperactive Ras1 nor elevated cAMP levels can enhance its filamentation (Moran et al., 2007). Supporting this notion, comparative genomics revealed that the *C. albicans* and *C. dubliniensis* Ras-cAMP pathway are not diverged (Jackson et al., 2009).

Chlamydospore Repression by Light Is Specific for *C. albicans*

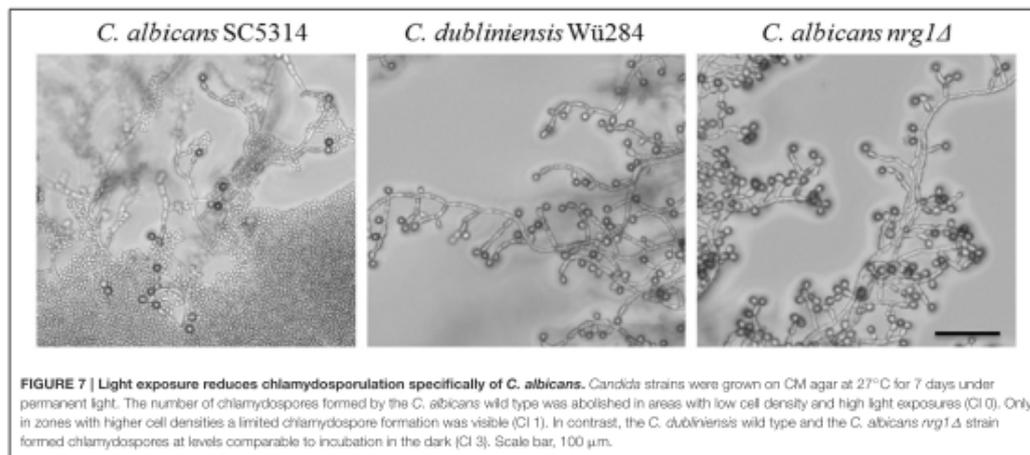
Finally, we tested the effect of light on chlamydosporulation in *Candida*. Incubation in darkness has been known for a long time as an inducer of chlamydospore formation by *C. albicans* (Dujardin et al., 1980a), but the light-sensing mechanism or its regulators are still unidentified. We verified the light sensitivity of the *C. albicans* wild type strain, which mostly failed chlamydosporulation on CM upon permanent light exposure. Interestingly, although complete darkness is generally thought to be required for their production, we observed *C. albicans* chlamydospores in areas of high cell density even under light (Figure 7). Furthermore, in contrast to the *C. albicans* wild type, both *C. dubliniensis* and the *C. albicans* *nrg1Δ* deletion mutant readily produced unaltered (CI 3) amounts of chlamydospores regardless of light exposure and cell density (Figure 7). The restoration of chlamydosporulation by the *C. albicans* *nrg1Δ* strain suggests that light exposure may be signaled via a pathway that triggers the central repressor Nrg1. On the other hand, *C. dubliniensis* is often found in environmental samples (Nunn

et al., 2007; McManus et al., 2009), which may have selected for a niche-adapted higher resistance to sunlight.

Other fungal species use light as a signal to regulate their life cycle and metabolism [reviewed in (Tisch and Schmoll, 2010)]. In the filamentous fungus *A. nidulans*, for example, light is sensed via the velvet complex, which controls sexual reproduction and production of secondary metabolites (Bayram et al., 2008). Velvet complex mutants of *A. nidulans* consequently fail conidiation and sexual sporulation (Kato et al., 2003). In addition, light sensing controls glucose metabolism in filamentous fungi, as illumination influences glycolysis, the pentose phosphate pathway, or the Krebs cycle (Tisch and Schmoll, 2010). All these processes are involved in glucose starvation and could therefore provide a link to the regulation of chlamydospore production in *Candida*. Comparative protein sequence analysis (PBLAST), however, revealed no evident homologs of phytochromes or other light sensors in *Candida* species. Therefore, although we found some clues to the signal transduction and the species-specific differences, the mechanism of light sensing itself remains obscure. Given the absence of evident light sensors, production of reactive oxygen species during light exposure may be suggested as an alternative mechanism, which could feasibly connect light to the chlamydospore-negative phenotypes of the *C. albicans* *hog1Δ* and *goa1Δ* deletion mutants, as the deleted genes are involved in stress responses (Eisman et al., 2006; Bambach et al., 2009).

CONCLUSION

Although chlamydospores of *C. albicans* have been under investigation for several decades, knowledge on their induction and regulation pathways is still fragmentary. On the other hand, assays which are based on the species-specific chlamydospore initiation are a widespread diagnostic method to distinguish between *C. albicans* and *C. dubliniensis* (Ellis et al., 2011). In this comparative study, we have examined



has intrinsically elevated levels of Tor1 activity which allow chlamydospore formation under conditions that are not sufficient to induce a starvation response in *C. albicans*. The chlamydosporulation defect of *C. albicans ras1Δ* was rescued by supplementation with cAMP, hinting toward a minimum requirement of cAMP, while a surplus of cAMP negatively affects chlamydospore formation of both *Candida* species, implying the presence of an optimal cAMP range for sporulation initiation.

Light, a common factor in the control of formation of sexual fungal spores, had a specific effect on *C. albicans* chlamydospore formation, which was reversible by *NRG1* gene deletion. As light exposure had an effect similar to nutrient supplementation, including the signaling via Nrg1, an overlap between these signaling pathways seems likely, although the topic of (species-specific) light sensing remains an important unexplored topic in chlamydosporulation.

In summary, this work expands our knowledge of chlamydospore formation by *Candida* species as a morphological transition next to the conversions between yeasts, pseudohyphae, and hyphae. We found that chlamydosporulation is a complex process that acts via and integrates different signal transduction pathways. While overlaps with hyphae-inducing pathways were obvious, some major hyphae-regulating factors like Ume6, Mep2, and Pde2 play only a minor role during sporulation, suggesting network re-use and rewiring during the evolution of this specific morphogenetic process.

REFERENCES

- Al-Hedaithy, S. S. A., and Fotedar, R. (2002). Recovery and studies on chlamydospore-negative *Candida albicans* isolated from clinical specimens. *Med. Mycol.* 40, 301–306. doi: 10.1080/mmy.40.3.301.306
- Angelos de la Torre-Ruiz, M., Torres, J., Ariño, J., and Herrero, E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 33468–33476. doi: 10.1074/jbc.M203515200
- Aronova, S., Wedaman, K., Anderson, S., Yates, J., and Powers, T. (2007). Probing the membrane environment of the TOR kinases reveals functional interactions between TORC1, actin, and membrane trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 18, 2779–2794. doi: 10.1091/mbc.E07-03-0274
- Bakerspigel, A. (1954). A preferred method for the routine identification of *Candida*. *J. Infect. Dis.* 94, 141–143. doi: 10.1093/infdis/94.2.141
- Bambach, A., Fernandez, M. P., Ghosh, A., Kruppa, M., Alex, D., Li, D., et al. (2009). Goa1p of *Candida albicans* localizes to the mitochondria during stress and is required for mitochondrial function and virulence. *Eukaryot. Cell* 8, 1706–1720. doi: 10.1128/EC.00066-09
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., et al. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506. doi: 10.1126/science.1155888
- Beck, T., and Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689–692. doi: 10.1038/45287
- Biswas, K., and Morschhäuser, J. (2005). The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 56, 649–669. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04576.x
- Campanha, N. H., Neppelenbroek, K. H., Spolidorio, D. M., Spolidorio, L. C., and Pavarina, A. C. (2005). Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* 11, 392–398. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01135.x

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: BB, PS, SB. Performed the experiments: BB, CP. Analyzed the data: BB, CP, BH, SB. Wrote the paper: BB, SB, BH.

FUNDING

This study was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grant STA 1147/1-1 and by the German Federal Ministry of Education and Health (BMBF) Germany (FKZ: 01EO1002, Integrated Research and Treatment Center, Center for Sepsis Control and Care (CSCC).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claude Pujol, William Fonzi, Alistair Brown, Arnold Bito, and Melanie Polke for generously sharing their *Candida* mutant strains, and we thank Selene Mogavero for critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01697/full#supplementary-material>

- Caplice, N., and Moran, G. P. (2015). *Candida albicans* exhibits enhanced alkaline and temperature induction of Efg1-regulated transcripts relative to *Candida dubliniensis*. *Genomics Data* 6, 130–135. doi: 10.1016/j.gdata.2015.08.026
- Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J., and Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13, 3271–3279. doi: 10.1101/gad.13.24.3271
- Chabasse, D., Bouchara, J. P., de Gentile, L., and Chennebault, J. M. (1988). *Candida albicans* chlamydospores observed *in vivo* in a patient with AIDS. *Ann. Biol. Clin.* 46, 817–818.
- Cherkasova, V. A., and Hinnebusch, A. G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. *Genes Dev.* 17, 859–872. doi: 10.1101/gad.1069003
- Citiulo, F., Moran, G. P., Coleman, D. C., and Sullivan, D. J. (2009). Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydospores cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res.* 9, 1051–1060. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00533.x
- Cramer, K. L., Gerrald, Q. D., Nichols, C. B., Price, M. S., and Alspaugh, J. A. (2006). Transcription factor Nrg1 mediates capsule formation, stress response, and pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 5, 1147–1156. doi: 10.1128/EC.00145-06
- Cutler, N. S., Pan, X., Heitman, J., and Cardenas, M. E. (2001). The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell* 12, 4103–4113. doi: 10.1091/mbc.12.12.4103
- Davis, D. A., Bruno, V. M., Loza, L., Filler, S. G., and Mitchell, A. P. (2002). *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* 162, 1573–1581.
- Dujardin, L., Walbaum, S., and Biguet, J. (1980a). Chlamydosporulation de *Candida albicans*: déroulement de la morphogenèse; influence de la lumière et de la densité d'ensemencement. *Ann. Microbiol.* 131A, 141–149.
- Dujardin, L., Walbaum, S., and Biguet, J. (1980b). Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydospores in synthetic culture media. *Mycopathologia* 71, 113–118.

- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D., Nombela, C., and Pla, J. (2006). The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 5, 347–358. doi: 10.1128/EC.5.2.347-358.2006
- Ells, R., Kock, J. L. F., and Pohl, C. H. (2011). *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? *Mycoses* 54, 1–16. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01759.x
- Fekete-Forgács, K., Szabó, E., and Lenkey, B. (1997). The formation of hyphae of *Candida albicans* induced by cyclodextrins. *Mycoses* 40, 451–453. doi: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00183.x
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B., and Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181, 6339–6346.
- Fonzi, W. A., and Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717–728.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y., and Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ara3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198, 179–182. doi: 10.1007/BF00328721
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077–1090. doi: 10.1016/0092-8674(92)90079-R
- Goldmark, J. P., Fazio, T. G., Estep, P. W., Church, G. M., and Tsukiyama, T. (2000). The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* 103, 423–433. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00134-3
- Griffin, G. J. (1976). Roles of low pH, carbon and inorganic nitrogen source use in chlamydospore formation by *Fusarium solani*. *Can. J. Microbiol.* 22, 1381–1389. doi: 10.1139/m76-202
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., and Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Mol. Biol. Evol.* 31, 232–238. doi: 10.1093/molbev/mst187
- Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F., and Schreiber, S. L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14866–14870. doi: 10.1073/pnas.96.26.14866
- Huang, J., Zhu, H., Haggarty, S. J., Spring, D. R., Hwang, H., Jin, F., et al. (2004). Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16594–16599. doi: 10.1073/pnas.0407117101
- Hudson, D. A., Sciascia, Q. L., Sanders, R. J., Norris, G. E., Edwards, P. J. B., Sullivan, P. A., et al. (2004). Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 150, 3041–3049. doi: 10.1099/mic.0.27121-0
- Inglis, D. O., and Sherlock, G. (2013). ras signaling gets fine-tuned: regulation of multiple pathogenic traits of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 12, 1316–1325. doi: 10.1128/EC.00094-13
- Jackson, A. P., Gamble, J. A., Yeomans, T., Moran, G. P., Saunders, D., Harris, D., et al. (2009). Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* 19, 2231–2244. doi: 10.1101/gr.097501.109
- Jansons, V. K., and Nickerson, W. J. (1970a). Chemical composition of chlamydospores of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 104, 922–932.
- Jansons, V. K., and Nickerson, W. J. (1970b). Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 104, 910–921.
- Jung, W. H., and Stateva, L. I. (2003). The cAMP phosphodiesterase encoded by *CaPDE2* is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology* 149, 2961–2976. doi: 10.1099/mic.0.26517-0
- Kamada, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2004). Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 73–84. doi: 10.1007/978-3-642-18930-2_5
- Kamthan, M., Mukhopadhyay, G., Chakraborty, N., Chakraborty, S., and Datta, A. (2012). Quantitative proteomics and metabolomics approaches to demonstrate N-acetyl-d-glucosamine inducible amino acid deprivation response as morphological switch in *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 369–378. doi: 10.1016/j.fgb.2012.02.006
- Kato, N., Brooks, W., and Calvo, A. M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development. *Eukaryot. Cell* 2, 1178–1186. doi: 10.1128/EC.2.6.1178-1186.2003
- Laxman, S., and Tu, B. P. (2011). Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-dependent cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 6:e26081. doi: 10.1371/journal.pone.0026081
- Lee, C. M., Nantel, A., Jiang, L., Whiteway, M., and Shen, S. H. (2004). The serine/threonine protein phosphatase *STT4* modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 51, 691–709. doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03879.x
- Lee, J. R., Morrow, C. A., and Fraser, J. A. (2013). Nitrogen regulation of virulence in clinically prevalent fungal pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 345, 77–84. doi: 10.1111/1574-6968.12181
- Liao, W. L., Ramon, A. M., and Fonzi, W. A. (2008). *GLN3* encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *C. albicans*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 514–526. doi: 10.1016/j.fgb.2007.08.006
- Limjindaporn, T., Khalaf, R. A., and Fonzi, W. A. (2003). Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by *GAT1*. *Mol. Microbiol.* 50, 993–1004. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03747.x
- Lin, X., and Heitman, J. (2005). Chlamydospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1746–1754. doi: 10.1128/EC.4.10.1746-1754.2005
- Mayer, F. L., Wilson, D., and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4, 119–128. doi: 10.4161/viru.22913
- McManus, B. A., Sullivan, D. J., Moran, G. P., D'enfert, C., Bougnoux, M. E., Nunn, M. A., et al. (2009). Genetic differences between avian and human isolates of *Candida dubliniensis*. *Emerging Infect. Dis.* 15, 1467–1470. doi: 10.3201/eid1509.081660
- Mitchell, A. P. (1994). Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 58, 56–70.
- Montazeri, M., and Hedrick, H. G. (1984). Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1341–1342.
- Moran, G. P., Coleman, D. C., and Sullivan, D. J. (2012). *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: why is *C. albicans* more pathogenic? *Int. J. Microbiol.* 2012:205921. doi: 10.1155/2012/205921
- Moran, G. P., MacCallum, D. M., Spiering, M. J., Coleman, D. C., and Sullivan, D. J. (2007). Differential regulation of the transcriptional repressor *NRG1* accounts for altered host-cell interactions in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol. Microbiol.* 66, 915–929. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05965.x
- Morschhäuser, J., Ruhnke, M., Michel, S., and Hacker, J. (1999). Identification of CARE-2-negative *Candida albicans* isolates as *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42, 29–32. doi: 10.1046/j.1439-0507.1999.00259.x
- Murad, A. M., Lee, P. R., Broadbent, I. D., Barelle, C. J., and Brown, A. J. (2000). Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*. *Yeast* 16, 325–327. doi: 10.1002/1097-0061(20000315)16:4<325::AID-YEA538>3.0.CO;2-#
- Murad, A. M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., et al. (2001). *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.* 20, 4742–4752. doi: 10.1093/emboj/20.17.4742
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kikado, M., Arisawa, M., and Aoki, Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 68, 6712–6719. doi: 10.1128/IAI.68.12.6712-6719.2000
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., and Nombela, C. (1997). Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2), 297–302. doi: 10.1099/00221287-143-2-297
- Nobile, C. J., Bruno, V. M., Richard, M. L., Davis, D. A., and Mitchell, A. P. (2003). Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 149, 3629–3637. doi: 10.1099/mic.0.26640-0
- Nobile, C. J., and Mitchell, A. P. (2009). Large-scale gene disruption using the UAU1 cassette. *Methods Mol. Biol.* 499, 175–194. doi: 10.1007/978-1-60327-151-6_17
- Nunn, M. A., Schäfer, S. M., Petrou, M. A., and Brown, J. R. M. (2007). Environmental Source of *Candida dubliniensis*. *Emerging Infect. Dis.* 13, 747–750. doi: 10.3201/eid1305.061179

- O'Connor, L., Caplice, N., Coleman, D. C., Sullivan, D. J., and Moran, G. P. (2010). Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* is governed by nutrient regulation of *UME6* expression. *Eukaryot. Cell* 9, 1383–1397. doi: 10.1128/EC.00042-10
- Palige, K., Lindé, J., Martin, R., Böttcher, B., Citiulo, F., Sullivan, D. J., et al. (2013). Global transcriptome sequencing identifies chlamydospore specific markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *PLoS ONE* 8:e61940. doi: 10.1371/journal.pone.0061940
- Palmer, G. E., Cashmore, A., and Sturtevant, J. (2003). *Candida albicans* *VPS11* is required for vacuole biogenesis and germ tube formation. *Eukaryot. Cell* 2, 411–421. doi: 10.1128/EC.2.3.411-421.2003
- Park, D. (1954). Chlamydospores and Survival in Soil Fungi. *Nature* 173, 454–455. doi: 10.1038/173454a0
- Ramon, A. M., Porta, A., and Fonzi, W. A. (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* 181, 7524–7530.
- Rocha, C. R., Schröppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B. N., et al. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 12, 3631–3643. doi: 10.1091/mbc.12.11.3631
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E., and Hall, M. N. (2004). Activation of the RAS/Cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 24, 338–351. doi: 10.1128/MCB.24.1.338-351.2004
- Shertz, C. A., and Cardenas, M. E. (2011). Exploiting and subverting tor signaling in the pathogenesis of fungi, parasites, and viruses. *PLoS Pathog.* 7:e1002269. doi: 10.1371/journal.ppat.1002269
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., and Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 288–305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- Smolinska, U. (2000). Survival of *Sclerotium cepivorum* sclerotia and *Fusarium oxysporum* chlamydospores in soil amended with cruciferous residues. *J. Phytopathol.* 148, 343–349. doi: 10.1111/j.1439-0434.2000.tb04785.x
- Sonneborn, A., Bockmühl, D. P., and Ernst, J. F. (1999). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* 67, 5514–5517.
- Staub, P., and Morschhäuser, J. (1999). Chlamydospore formation on Staub agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42, 521–524. doi: 10.1046/j.1439-0507.1999.00516.x
- Staub, P., and Morschhäuser, J. (2005). Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol. Microbiol.* 55, 637–652. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04414.x
- Staub, P., and Morschhäuser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1–12. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x
- Sullivan, D. J., and Moran, G. P. (2011). Differential virulence of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*: A role for Tor1 kinase? *Virulence* 2, 77–81. doi: 10.4161/viru.2.1.15002
- Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. E., and Coleman, D. C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141 (Pt 7), 1507–1521. doi: 10.1099/13500872-141-7-1507
- Tisch, D., and Schmol, M. (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1259–1277. doi: 10.1007/s00253-009-2320-1
- Tourna, H., Tripathi, G., Bertram, G., Macaskill, S., Mavor, A., Walker, L., et al. (2005). Global role of the protein kinase Gcn2 in the human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1687–1696. doi: 10.1128/EC.4.10.1687-1696.2005
- Tripathi, G., Wiltshire, C., Macaskill, S., Tournu, H., Budge, S., and Brown, A. J. P. (2002). Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J.* 21, 5448–5456. doi: 10.1093/emboj/cd507
- Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* 5:656. doi: 10.3389/fmicb.2014.00656
- Vivier, M. A., Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. (1997). Coregulation of starch degradation and dimorphism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 405–435. doi: 10.3109/10409239709082675
- Walther, A., and Wendland, J. (2003). An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr. Genet.* 42, 339–343. doi: 10.1007/s00294-002-0349-0
- Wilson, R. B., Davis, D., and Mitchell, A. P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J. Bacteriol.* 181, 1868–1874.
- Yi, S., Sahn, N., Daniels, K. J., Lu, K. L., Srikantha, T., Huang, G., et al. (2011). Alternative mating type configurations (α/α versus α/α or $\alpha/\alpha/\alpha$) of *Candida albicans* result in alternative biofilms regulated by different pathways. *PLoS Biol.* 9:e1001117. doi: 10.1371/journal.pbio.1001117
- Zeidler, U., Lettner, T., Lassnig, C., Müller, M., Lajko, R., Hintner, H., et al. (2009). *UME6* is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9, 126–142. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00459.x
- Zhang, A., Shen, Y., Gao, W., and Dong, J. (2011). Role of Sch9 in regulating Ras-cAMP signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 585, 3026–3032. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.023

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Böttcher, Pöllath, Staub, Hube and Branke. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.4 Manuskript 4: tRNA-Modifikationen als Virulenzdeterminante in *C. albicans*

“tRNA modifications: a novel virulence factor in the human pathogen *Candida albicans*”

Bettina Böttcher, Bianka Morgner, Peter Sarin, Daniela Schulz, Stefanie Allert, Ilse D. Jacobsen, Hannes Drexler, Sebastian Leidel, Sascha Brunke

Manuskript in Vorbereitung für die Einreichung zur Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift.

Inhaltsangabe

Candida dubliniensis ist der engste genetische Verwandte der humanpathogenen Hefe *C. albicans*, jedoch unterscheiden sie sich in der Ausprägung phänotypischer Merkmale, die zu einer verminderten Virulenz von *C. dubliniensis* beitragen. Hier wurde in einem zwischenartlichen Vergleich der neuartige Faktor Hma1 als eine genetische Determinante der *C. albicans*-spezifischen Pathogenität identifiziert. Dabei agiert Hma1 in einem nährstoffabhängigen Prozess, so dass einerseits die heterologe Genexpression von *CaHMA1* in *C. dubliniensis* die Koloniemorphologie auf Stickstoffmangelmedium entscheidend veränderte und *C. albicans hma1Δ/Δ*-Deletionsmutanten eine erhöhte Rapamycin-Resistenz aufwiesen. Der Hma1-Verlust führte zu einer *C. albicans*-spezifischen Reduktion der Hyphenlänge *in vitro* und während der Infektion von humanen oralen Epithelien. Hinweise auf eine Rolle von Hma1 in virulenzassoziierten Prozessen wurden *ex vivo* durch ihre verminderte Fähigkeit zur Adhärenz und Invasion von Epithelzellen ersichtlich und diese bestätigte sich durch signifikant erhöhte Überlebensraten von Hühnerembryonen nach Infektion mit *C. albicans hma1Δ/Δ*-Mutantenstämmen im Vergleich zum Wildtyp. Das Hma1-Ortholog Tcd2 in *S. cerevisiae* ist ein tRNA-modifizierendes Enzym, das spezifische Adeninmoleküle in direkter Nachbarschaft des Anticodons chemisch verändert und damit direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit und Genauigkeit der Translation nimmt. Mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Untersuchungen konnte die Threonylcarbamoyladenosen-Dehydrataseaktivität von Hma1 auch in *C. albicans* nachgewiesen werden. Folglich belegt diese Arbeit erstmalig einen kausalen Zusammenhang zwischen korrekter tRNA-Basenmodifikation und der Pathogenität pilzlicher Erreger.

Eigenanteil

Bettina Böttcher hat die Experimente selbstständig geplant. Des Weiteren hat sie die Experimente, ausschließlich die quantitativen Analysen der tRNA-Modifikationen und Infektionsexperimente, selbst durchgeführt und diese angeleitet, die Daten ausgewertet und die entsprechenden Hypothesen und Schlussfolgerungen formuliert. Darüber hinaus hat sie das Manuskript zu großen Teilen geschrieben und die Abbildungen erstellt.

Geschätzter prozentualer Anteil der Autoren

Bettina Böttcher:	50%	Bianka Morgner:	10%
Peter Sarin:	7%	Daniela Schulz:	4%
Stefanie Allert:	2%	Ilse D. Jacobsen:	4%
Hannes Drexler:	3%	Sebastian Leidel:	4%
Sascha Brunke:	16%		

Bernhard Hube

1 **tRNA modifications: a novel virulence factor in the human pathogen *Candida albicans***

2 **Short title: tRNA modifications in *Candida spp.***

3 **Authors**

4 **Bettina Böttcher**^{1,2}, **Bianka Morgner**¹, **Peter Sarin**^{3,4,5}, **Daniela Schulz**¹, **Stefanie Allert**¹, **Ilse D.**
5 **Jacobsen**⁶, **Hannes Drexler**⁷, **Sebastian Leidel**^{3,4} and **Sascha Brunke**^{1,8}

6
7 ¹ *Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Leibniz Institute for Natural Product Research*
8 *and Infection Biology – Hans Knoell Institute Jena, Germany*

9 ² *Junior Research Group Host Fungal Interfaces, Center for Innovation Competence (ZIK) SEPTOMICS,*
10 *Jena, Germany*

11 ³ *Max Planck Research Group for RNA Biology, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine,*
12 *Münster, Germany*

13 ⁴ *Cells-in-Motion Cluster of Excellence, University of Münster, Münster, Germany*

14 ⁵ *Department of Biosciences, Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki,*
15 *Finland*

16 ⁶ *Research Group Microbial Immunology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection*
17 *Biology – Hans Knoell Institute Jena, Germany*

18 ⁷ *Bioanalytical Mass Spectrometry Unit, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster,*
19 *Germany*

20 ⁸ *Integrated Research and Treatment Center, Sepsis und Sepsisfolgen, Center for Sepsis Control and*
21 *Care (CSCC), University Hospital Jena, Germany*

22

23

24 **Author Contributions**

25 Conceived and designed the experiments: BB SB

26 Performed the experiments: BB BM PS DS SA HD

27 Analyzed the data: BB BM PS IDJ SL SB

28 Contributed reagents/materials/analysis tools: PS HD IDJ SD SB

29 Wrote the paper: BB SB

30

31 **Summary**

32 *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* are important facultative pathogenic fungi and frequent
33 colonizers of the human gastrointestinal tract. *C. albicans* is the most common cause of life-
34 threatening invasive candidiasis while its closest relative, *C. dubliniensis*, more frequently causes
35 superficial infections with very low mortality. One reason for these clinical differences is the higher
36 propensity of *C. albicans* to form virulence-associated hyphae. Here, we used a cross-species
37 comparison of genetic differences to detect a novel factor, Hma1, which regulates species-specific
38 morphological transitions under nitrogen starvation. In fact, *C. albicans hma1Δ/Δ* deletion mutants
39 were impaired in filamentation, adherence and invasion of oral epithelial cells. Hma1 acts via
40 nutrient-responsive pathways, as *C. albicans hma1Δ/Δ* mutants display elevated resistance against
41 the TOR-pathway antagonists, rapamycin and caffeine. *In vivo* experiments furthermore revealed a
42 role of Hma1 in virulence of *C. albicans*.

43 The *Candida* Hma1 is an ortholog of the tRNA-modifying enzyme Tcd2 in *Saccharomyces cerevisiae*.
44 Many post-transcriptional tRNA modifications are evolutionary conserved and facilitate accuracy and
45 efficiency of translational events. We demonstrate the link of the Hma1 tRNA
46 threonylcarbamoyladenine dehydratase to the virulence-associated morphology. In conclusion, we
47 show that proper tRNA modifications are important in the pathogenicity of *Candida* species and can
48 be considered fungal virulence factors.

49 **Author Summary**

50 *Candida* species are common colonizers of a healthy human gut. In predisposed individuals these
51 yeasts represent the world's leading cause of dangerous fungal infections, but the degree of severity
52 of disease is species-specifically determined. Genetic tools were used to compare the most
53 pathogenic *Candida* species *C. albicans* with its more harmless relative *C. dubliniensis* and a novel
54 factor called Hma1 that contributed to species-specific behavior was identified. To define its
55 biological role *hma1Δ/Δ* deletion mutants were investigated under infection-associated conditions.
56 Striking alterations in morphology, the ability to colonize human epithelia and the mortality of
57 infected embryonated chicken eggs were detected. Comparative bioinformatical analyses revealed
58 the molecular function of the Hma1 enzyme which catalyzes a modification at transfer RNA
59 molecules. Since tRNAs facilitate protein biosynthesis, changes in their modification levels could
60 result in broad cellular effects which were reflected in the lower virulence potential of *C. albicans*
61 *hma1Δ/Δ* deletion mutants. This is the first study that proves a direct connection between the
62 pathogenicity of a human fungal pathogen and proper tRNA modifications. The outcome helps to
63 understand molecular networks in pathogens which is essential to combat infections.

64

65 **Introduction**

66 **Diverse tRNA modifications for diverse functions**

67 tRNA molecules present the structural interface between the RNA and protein worlds. However, in
68 addition to their primary decoding function, tRNAs also play important roles in maintaining overall
69 translation pace and accuracy, and they are known to impact primary metabolism (1) as well as affect
70 stress responses (2). These functions depend on a plethora of precise modifications of the tRNA
71 molecule itself. For example, an average baker's yeast cell exhibits 25 different types of modifications
72 on 36 different locations in its cytoplasmatic tRNA molecules (3), which makes tRNAs the most
73 heavily modified of the RNA species. In fact, most genomes contain more genes for tRNA
74 modification and processing than for the tRNA molecules themselves (4). Prominent examples are
75 the elongator tRNA modification complex (ELP) (5) and the Endopeptidase-like Kinase Chromatin-
76 associated protein (KEOPS/EKC) complex, comprising Tcs1-Tcs7 in *Saccharomyces cerevisiae* (6, 7),
77 which catalyze complex uridine ($mcm^2s^2U_{34}$) and adenosine (t^6A_{37}) modifications of the anticodon
78 stem loop (ASL), respectively.

79 Nucleotides within the anticodon and close to it are modification hot spots with a high importance
80 for translational efficiency and fidelity (via suppression of frame-shifts). On the other hand,
81 modifications also ensure the flexibility required for wobble base decoding (8). Besides the wobble
82 position itself, the purine base 37 – directly adjacent to the anticodon – is frequently highly modified
83 by a variety of functional groups (9). Most widely distributed and generally well-conserved are t^6A
84 (threonylcarbamoyl-adenosine), i^6A (isopentenyl-adenosine), and m^1G (1-methylguanosine)
85 modifications which both facilitate mRNA-to-tRNA binding stability and prevent misreading errors (1,
86 10). N^6 -threonylcarbamoyl-adenosine, first described in 1974 (11), turned out to be a hydrolyzed
87 cyclic threonylcarbamoyl-adenosine (ct^6A) that is common in bacteria, fungi, and plants (12). Defects
88 in modifications of the ASL are lethal for most bacteria (13) and result in a broad range of
89 phenotypes in yeast, including higher susceptibility to diverse stressors (14), defects in translation,
90 and aggregation of misfolded proteins (7).

91 Via different modifications and charging statuses, tRNAs become not solely simple joints between
92 mRNAs and the nascent protein, but can also act as messenger molecules for the nutritional state of
93 the cell. Uncharged tRNAs accumulate in the yeast cytoplasm under amino acids depletion, where
94 they are bound by the Gcn2 kinase (15) that initiates the activation of the transcription factor Gcn4
95 via phosphorylation of the exchange factor eIF-2 α , inducing the expression of amino acid

2

96 biosynthesis genes. This Tor1 kinase-dependent pathway is known as the general amino acid control
97 (GAAC). tRNA modifications at the ASL have been associated with this regulation cascade: a *S.*
98 *cerevisiae* *tcs2Δ* mutant, defective in threonylcarbamoyl adenosine modification of ANN codon-
99 tRNAs, lacks the Gcn2-dependent Gcn4 activation (16). Furthermore, the amino acid- and nitrogen
100 starvation-induced pseudohyphal growth of *S. cerevisiae* can be blocked by a lack of tRNA thiolation
101 at the ASL (17).

102
103

104 ***Candida albicans* and *C. dubliniensis*: Small differences with large consequences**

105 *Candida* species are fungal pathogens which frequently cause bloodstream infections with high
106 mortality rates. For these (often) nosocomial infections, *Candida albicans* is by far the leading cause
107 (18, 19). In contrast, its closest relative, *Candida dubliniensis*, rarely causes life-threatening infections
108 (20), but is still detectable in up to one third of oral candidosis in HIV-infected patients (21). Although
109 the vast majority of *C. dubliniensis* genes share sequence identities of over 80 % with their *C. albicans*
110 orthologs, certain pathogenicity-related genes differ highly in sequence or are even absent in
111 *C. dubliniensis* (22). These genomic differences are reflected not only in epidemiology, but also in *in*
112 *vitro* settings, where *C. dubliniensis* is less robust against oxidative, osmotic, and temperature
113 stresses (23).

114 Both, *C. albicans* and *C. dubliniensis* are polymorphic fungi that rely on yeast-hyphae transitions for
115 tissue invasion and dissemination within their host (21, 24). However, the regulation of hyphae
116 induction in response to nutrient availability, mediated by the transcription factors Nrg1 (25), Ume6
117 (26), and Efg1 (27), differs significantly between the two species, and species-specific differences
118 have also been reported in Tor1-dependent hyphae induction (28). *Ex vivo*, on reconstituted human
119 epithelium, *C. dubliniensis* furthermore fails to produce germ tubes and consequently cannot invade
120 the tissue – in stark contrast to the highly invasive *C. albicans*. The overall lower virulence of
121 *C. dubliniensis* finally also manifests in different animal models like mice (29) or embryonated chicken
122 eggs (30). Therefore, investigating the few genetic differences between *C. albicans* and *C. dubliniensis*
123 should provide us with important information about species-specific stress responses, regulators of
124 morphogenesis, and pathogenicity-related pathways.

125 In this study, we employ a cross-species approach to reveal a novel role for a *C. albicans* tRNA
126 modifying enzyme, Hma1, during starvation-induced morphogenesis and link it to the TOR pathway
127 regulon. Finally, we investigate the impact of *HMA1* in *C. albicans* under infection-mimicking *in vitro*
128 conditions and in a chicken egg infection model to reveal the importance of tRNA modifications
129 during *Candida* infections.

130

131 **Results**132 **Identification of *C. dubliniensis* transformants with diminished chlamyospore formation under**
133 **nitrogen starvation**

134 While genetically closely related, *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* differ markedly in their
135 clinical incidence and etiopathology (23). To uncover genes that contribute to these differences in
136 virulence, we tested a library of *C. albicans* genomic fragments integrated into the *C. dubliniensis*
137 strain CdUM4A, a derivative of the commonly used wild type Wü284 (25). During a recent study, we
138 detected interesting morphological differences already between the wild types of the two species
139 when grown on the nitrogen-limiting SLAD agar (31). At 37°C, SLAD agar is an established medium for
140 hyphae induction in *C. albicans* (32). However, after prolonged (three days) incubation at lower
141 temperatures (27-30 °C) in darkness we noted extensive chlamyospore production by
142 *C. dubliniensis*, whereas *C. albicans* remained in the yeast form (figure 1A, 1B) and (31). This
143 observation was confirmed with chlamyospore-specific GFP reporter strains (33). A strong GFP
144 signal was detected in *C. dubliniensis*, whereas the yeast cells of *C. albicans* did not fluoresce (figure
145 S2). Hence, SLAD agar induces chlamyospore (and pseudohyphae) formation solely in
146 *C. dubliniensis*.

147 We used this finding to screen for novel morphology-associated *C. albicans* genes in our library. In
148 total, about 20,000 transformants were grown on SLAD agar under chlamyospore-inducing
149 conditions. By microscopical selection, we found smooth colonies of *C. dubliniensis* transformants
150 that phenocopied the *C. albicans* colony appearance. One clone, CdINT2, showed a strong and
151 reproducible reduction in sporulation and filamentation (figure 1C). Sequence analysis of its
152 integrated *C. albicans* DNA fragment revealed an assembly of three adjacent open reading frames
153 (*orf19.2113*, *orf19.2114* and *orf19.2115*).

154 **HMA1 is a regulator of morphogenesis in *C. albicans* and interacts with the TOR pathway**

155 To determine which of these transferred open reading frames was responsible for the phenotype,
156 each gene including its up- and downstream untranslated regions was separately integrated into the
157 original *C. dubliniensis* parental strain CdUM4A. Integration of neither *orf19.2113* nor *orf19.2114*
158 affected pseudohyphae or chlamyospore formation (data not shown). Only the strain bearing the
159 *C. albicans orf19.2115* (strain Cd2115) mimicked largely the colony morphology of *C. albicans* and the
160 original integrant strain on SLAD-agar (figure 1D). The ortholog of *orf19.2115* in *S. cerevisiae*, *TCD2*,
161 encodes a tRNA threonylcarbamoyladenosine dehydratase (12). As the common gene name *TCD2* is
162 already in use in *C. albicans*, and in light of its biological function, we decided to name this gene
163 *HMA1* (for **H**yper**M**odification of **A**denine). Its *C. dubliniensis* ortholog (*CD36_15150*) will
164 consequently be named CdHMA1 in this text to differentiate the two genes.

165 For a detailed characterization, *hma1Δ/Δ* deletion mutants were then created in *C. albicans* and in
166 *C. dubliniensis* (*Cdhma1Δ/Δ*). Additionally, revertants were obtained by integration of one allele into
167 the native genomic region, resulting in strains *hma1Δ/HMA1* (*C. albicans*) and *Cdhma1Δ/CdHMA1*
168 (*C. dubliniensis*). Finally, CdHMA1 was deleted in Cd2115 to obtain a *C. dubliniensis* CdHMA1-
169 deficient strain which carries only the *C. albicans HMA1* in one copy (*Cd2115_Cdhma1Δ/Δ*). All
170 strains were verified by Southern blotting (figure S1).

171 Our initial screen to detect *HMA1* used a nitrogen-poor medium. The TOR pathway is well known as a
172 central regulation cascade for responding to nutritional stresses in eukaryotes (34). Hence, we tested
173 the growth of the *C. albicans* wild type strain SC5314, the *C. albicans hma1Δ/Δ* deletion mutants, and
174 the revertant *hma1Δ/HMA1* in the presence of sublethal concentrations of the TOR antagonists
175 rapamycin and caffeine. In YPD cultures without additives, all strains grew fast and reached a plateau
176 within 16 h, with only a very slight delay by the *hma1Δ/Δ* as well as the *hma1Δ/HMA1* revertant
177 strains (figure 2A). Addition of 5 nM rapamycin or 7.5 mM caffeine (figure 2B and 2C) to the medium

178 increased the generation times in all strains, but under both conditions the *C. albicans hma1Δ/Δ*
 179 mutants were significantly less affected than the wild type strain. The complemented strain bearing
 180 one *HMA1* allele showed an intermediate growth. Together, this indicates an involvement of Hma1 in
 181 Tor1-mediated signaling.

182 It is known that presence of the threonine analogue L-homoserine suppresses the growth defect of
 183 t⁶A tRNA modification-defective *S. cerevisiae* mutants to exceed even wild type levels (7).
 184 Interestingly, the *hma1Δ/Δ* deletion mutants similarly grew better than the *C. albicans* wild type and
 185 the complemented strain when 1 mg/ml L-homoserine was present as the sole nitrogen source in
 186 minimal medium (figure 2D). The deletion of *Cdhma1Δ/Δ* in the *C. dubliniensis* strains Wü284 and
 187 Cd2115 however did not influence the proliferation rates (figures 2H and S3D). Furthermore, when L-
 188 threonine or ammonium sulfate was provided instead of L-homoserine, the growth of *C. albicans*
 189 *hma1Δ/Δ* deletion mutants was identical to the wild type (data not shown). These data first hinted
 190 toward a possible involvement of *C. albicans HMA1* in tRNA modifications.

191 All tested *C. dubliniensis* strains grew equally well in YPD media (figures 2E and S3A), but in direct
 192 contrast to *C. albicans*, *C. dubliniensis Cdhma1Δ/Δ* strains exhibited an increased sensitivity to
 193 rapamycin (figure 2F) and caffeine (figure 2G). The *C. dubliniensis* Cd2115 strain, which contains an
 194 additional *C. albicans HMA1*, was more sensitive to rapamycin and caffeine than its wild type (figure
 195 S3), reflecting the negative impact of *HMA1* in *C. albicans* on TOR inhibitor resistance. An additional
 196 deletion of *Cdhma1Δ/Δ* in this background, in contrast, did not change the Cd2115 rapamycin (figure
 197 S3B) or caffeine (figure S3C) phenotypes. This suggests that despite the opposing effects of the
 198 deletion, presence of *C. albicans HMA1* alone sufficient to elicit sensitivity.
 199

200 The TOR pathway is important for responding to the cellular nutritional status. Hence, growth with
 201 the non-fermentable carbon sources glycerol and ethanol, as well as proliferation under nitrogen
 202 limitation were tested, but we found no evident effect of the *HMA1* deletion in both *Candida* species.
 203 Similarly, a *C. albicans hma1Δ/Δ* mutant showed no phenotypic effect when tested with other
 204 stressors, including oxidative (5 mM H₂O₂, 50 mM menadione), antifungal (2 µg/ml tunicamycin,
 205 6 µg/ml fluconazole), cell wall (300 µg/ml congo red, 50 µM calcofluor white), and osmotic
 206 (1 M NaCl, 0.3 M LiCl) stress (data not shown). This profile hints toward a specific role for *HMA1* in
 207 TOR-driven signaling, rather than a global effect, similar to the phenotypes of *S. cerevisiae* t⁶A-
 208 deficient strains and strengthening the notion of an involvement of Hma1 in tRNA modifications (7).

209 Many tRNA modifications are known to be mediators of the heat stress response (35). In line with
 210 that, a slight decrease in growth was observed for *C. albicans hma1Δ/Δ* strains during incubation at
 211 42 °C (figure S4A). The *C. dubliniensis Cdhma1Δ/Δ* mutants were similarly retarded in growth at 41°C,
 212 the maximal growth-supporting temperature of this species (figure S4B). The presence of an
 213 additional *C. albicans HMA1* gene copy in *C. dubliniensis* Cd2115 did not influence heat resistance.
 214 Therefore, we assume a species-independent role for *HMA1* during heat stress.

215 **Hma1 has a species-specific role during hyphae formation**

216 The ability of *Candida* species to undergo yeast-to-hyphae transitions is considered one of the most
 217 important pathogenicity strategies of these fungi. It also serves as a reliable method to distinguish
 218 pathogenic yeast species like *C. albicans* and *C. dubliniensis* under defined conditions (29, 36). Given
 219 the previously observed involvement of *HMA1* in morphology, we assayed the filamentation
 220 capacities of all strains using diverse solid and liquid media. These comprised minimal or nutrient-
 221 deprived agar (water agar and SLAD agar) and complex media (YPD, Spider, and chocolate agar, and
 222 water + 10% FCS liquid medium) at different temperatures.

223 The *C. albicans hma1Δ/Δ* deletion mutants showed clearly impaired hyphae fringes on the colony
 224 borders on chocolate agar, Spider agar and YPD agar (figure 3A-C) after incubation at 37 °C for five

5

225 days. This phenotype was nearly fully reverted in the *hma1Δ/HMA1* strain. In contrast, in all strains
 226 the central wrinkling of the colonies was comparable to the wild type (figure 3A-C). This indicates a
 227 specific reduction in longer hyphal elements which invade the agar surface rather than a general loss
 228 of filamentation. Notably, no alterations in filamentation of the *C. albicans hma1Δ/Δ* mutants were
 229 observed on minimal agar plates (water agar and on SLAD agar). Thus, we propose that *HMA1* acts
 230 via nutrient-driven signaling pathways.

231 Generally, *C. dubliniensis* shows little to no propensity for hyphae formation on standard agar plates.
 232 Only on minimal medium agar at 37°C, a late robust hyphae formation without any central wrinkling
 233 was observed. However, under these conditions the deletion, revertant, and transformant mutants
 234 exhibited no difference to the *C. dubliniensis* wild type (figure S5A-C), indicating that in contrast to
 235 *C. albicans*, Cdhma1 plays no role in *C. dubliniensis* filamentation on agar plates.

236 We hence also tested *C. albicans* and *C. dubliniensis* in liquid medium, i.e. water supplemented with
 237 10% calf serum. Hyphae length of *C. albicans* wild type after four hours reached in average 55.8 μM,
 238 whereas the hyphae of the two independent *hma1Δ/Δ* mutants were significantly shorter with 41.9
 239 and 40.4 μm (reduction by approximately 25%; figure 4A). The complemented strain reached almost
 240 wild type levels, at 52.1 μm mean length. Similar reductions in hyphae length by *C. albicans hma1Δ/Δ*
 241 were observed in liquid Spider medium, DMEM and DMEM with 10% FCS (data not shown). In stark
 242 contrast, the *C. dubliniensis* hyphae length in water-serum medium increased significantly in
 243 *Cdhma1Δ/Δ* mutants (140.5% and 141.2% of wild type length), a phenotype which was largely
 244 reversed by re-introduction of *CdHMA1* (figure 4B). Introduction of *C. albicans HMA1* into
 245 *C. dubliniensis* also led to longer filaments, which could not be increased further by additional
 246 disruption of the native *CdHMA1* alleles. This shows that the effect of Hma1 differs strikingly
 247 between the two species, and that *C. albicans* Hma1 promotes growth of long hyphae under many
 248 different conditions. We hence continued to investigate the molecular function of Hma1 as well as its
 249 role in virulence.

250 ***C. albicans HMA1* encodes a tRNA modifying enzyme**

251 The gene *TCD2*, which encodes a tRNA threonylcarbamoyladenine dehydratase in *Saccharomyces*
 252 *cerevisiae*, shows high protein similarity with *C. albicans* Hma1 (identities 60.2%, positives 77.0%)
 253 and *C. dubliniensis* Cdhma1 (61.4%, 78.4%) and most important structural protein components were
 254 identical in *C. albicans* and baker's yeast (figure 5A). The ubiquitin-like E1 activating domain is
 255 present in different tRNA-modifying enzymes like Uba4 and represents the functional center of these
 256 enzymes (37). Based on functional analyses of Tcd1/Tcd2 in *S. cerevisiae* (12), the CaHma1 enzyme
 257 very likely targets a threonylcarbamoylated adenosine residue at position 37 (t⁶A₃₇) specifically in
 258 tRNAs bearing an NNU anticodon. There it catalyzes the dehydration to form an oxazolone ring
 259 (ct⁶A₃₇) under ATP consumption (12) (figure 5B).

260 **Prediction of putative effector genes that rely on ct⁶A₃₇ modification during translation processes**

261 As Hma1 affects ANN codon-pairing tRNAs via formation of cyclic t⁶A₃₇ modifications, we investigated
 262 whether these codons are enriched in genes possibly involved in morphology regulation. In bacteria,
 263 t⁶A₃₇ modifications affect genes with multiple ANN codons more they if occur in long stretches rather
 264 than being distributed (13). Hence, we scanned the *C. albicans* genome for genes with long ANN
 265 stretches using a normalized cluster score (a measurement of ANN clustering) of ≥ 1.0 (details in
 266 material and methods section and table S2). The 7.5% highest scoring genes in the *C. albicans* and
 267 *C. dubliniensis* genome were analyzed for GO term enrichment. We found a significant enrichment of
 268 transcription factors for both species (figure 6 and table S2). Of these transcription factor genes, 13
 269 were shared by *C. albicans* and *C. dubliniensis*, but we identified some species-specific genes that
 270 could contribute to the divergent phenotypes. Examples include the *C. albicans* zinc-finger
 271 transcription factor *ZFU2*, which has been described to play a role during adherence to surfaces (38),
 272 and *C. dubliniensis* *SLF2* as a known factor for virulence differences in *C. albicans* and *C. dubliniensis*

273 (39). The reduction in invasive hyphae formation may thus be at least partly explained by
274 translational, rather than transcriptional repression or dysregulation of certain transcription factors.

275 Proteins whose arginine residues are solely ANN-encoded are highly affected in t⁶A-defective
276 mutants of *S. cerevisiae* (7). Therefore, *Candida* genes were sorted by their preference to use ANN-
277 codons for arginine (table S2). We found an enrichment for structural components of ribosome
278 biogenesis and transmembrane transporters, which we however could link to translational efficiency
279 but not to morphogenesis.

280 ***hma1Δ/Δ* deletion reduces adherence and invasiveness into oral epithelial cells**

281 Having established a connection between Hma1, tRNA modification, and morphogenesis, we
282 investigated adhesion and invasion as the two primary steps in *Candida* infections. We infected the
283 human oral epithelial TR146 cell line with *C. albicans* wild type, *hma1Δ/Δ* deletion and revertant
284 strains. After three hours, 25.7% of wild type cells were found adhered to the host cells, but only
285 13.0% and 15.4% of the two independent *hma1Δ/Δ* strains, a reduction by more than half (51% and
286 60%, respectively). This phenotype was mostly reverted with the single *HMA1* allele-bearing
287 *hma1Δ/HMA1* strain at 21.2% adherence (only 18% reduction, figure 6A).

288 Differential staining of hyphae allowed us to measure invasiveness. Here, invasiveness was defined as
289 the proportion of hyphae with any invasive part relative to all adherent cells. Of the *C. albicans* wild
290 type cells, 36.0% were invasive, while the *hma1Δ/Δ* mutants were significantly reduced to 24.0% and
291 25.8% invasiveness (i.e., by about one third; figure 6B). The complemented strain again completely
292 regained wild type levels of invasiveness at 41.5%. Similarly, the total hyphae length of *hma1Δ/Δ*
293 strains was reduced to 76.3% and 80.5% of the wild type (figure 6C), in agreement with our *in vitro*
294 water-serum medium data. Interestingly, if a hypha had successfully invaded epithelial cells, the
295 length of the invasive part did not differ significantly (figure 6D). This indicates that adhered growth
296 and initial invasion, but not subsequent elongation inside the host cell was inhibited.

297 **Lack of ct⁶A₃₇ attenuates virulence of *C. albicans* in vivo**

298 Given the *in vitro* effects of the *HMA1* deletion on hyphae, we predicted an impact of the loss of
299 ct⁶A₃₇ modification on *C. albicans* virulence. To test this hypothesis, we employed an embryonated
300 chicken egg infection model established in our lab (40). For the experiment, eggs were infected in
301 batches of 20 with 10⁷ (high infection dose) or 10⁵ (low dose) yeast cells per egg of the *C. albicans*
302 wild type strain, the *hma1Δ/Δ* deletion mutants, or the complemented *hma1Δ/HMA1* strain. Vitality
303 of avian embryos as the read-out for fungal virulence was monitored over seven days.

304 As expected, infection with the high dose of *C. albicans* proved highly lethal and consistently led to
305 rapid death within the first three day with all strains (data not shown). However, with the lower
306 infection dose where fungal growth and invasion became more relevant, significant strain differences
307 were observed. Injection of *C. albicans* wild type resulted in a high overall mortality of 92.5% at day
308 seven (Fig. 8). In the same time frame only 27.5% of chicken embryos succumbed to one of the
309 *hma1Δ/Δ* mutants (strain B), a phenotype which could be reverted to an intermediate extent of
310 52.5% mortality in the isogenic *hma1Δ/HMA1* strain. The second independent *hma1Δ/Δ* knockout
311 mutant (strain A) was similarly severely attenuated in virulence, but at a lower overall level than
312 strain B. Together, these data show that presence of Hma1 is required for full virulence of *C. albicans*.

313 **Discussion**314 **Cross-species comparisons are useful tools to elucidate virulence factors**

315 We started our investigation by exploring the genetic differences between *C. albicans* and its closely
 316 related sister species, *C. dubliniensis*. During evolution subpopulations of microorganisms can adapt
 317 to novel niches and new, beneficial genetic attributes are fixated (41). Adaptation to a host often
 318 leads to the acquisition of pathogenic features which are absent in related avirulent or less virulent
 319 sister species. Genomic cross-species comparisons can be a useful tool to get insights into the genetic
 320 basis of species-specific lifestyles of related microorganisms. A recent showcase study used
 321 pathogenic and environmental *Burkholderia* species, where a comparative RNA-Seq based approach
 322 revealed specific quorum-sensing systems depending on their native niches (42).

323 In our case, while *C. albicans* seems to have acquired a number of specific virulence factors like
 324 hydrolytic enzymes or hyphae-associated genes (23), the less pathogenic *C. dubliniensis* underwent
 325 reductive evolution instead (22). Similarly, cross-species transcriptome comparison of these *Candida*
 326 species has revealed differences in expression of orthologous, virulence-associated genes like *ECE1*
 327 (43, 44). Hence, in order to further identify novel pathogenicity-associated factors of *C. albicans*, a
 328 genomic fragment library was integrated into *C. dubliniensis* (25) and we screened the resultant
 329 strains for effects on morphology, which is known to play a central role in *C. albicans* virulence.
 330 Whereas all previously used media that induced chlamydospores specifically in *C. dubliniensis* rely on
 331 natural ingredients, especially plant-derived components (24, 45), we verified SLAD agar as an
 332 alternative medium. SLAD agar has a consistent and reproducible composition which makes this
 333 synthetic medium likely even better suitable for discriminative *Candida* diagnostics.
 334 The approach to integrate a genomic *C. albicans* library into *C. dubliniensis* was first used by Staib *et*
 335 *al.* to discover the role of Nrg1 as a major *C. albicans* chlamydospore repressor (25). In fact, we found
 336 a similar phenotype by integration of the previously uncharacterized *C. albicans* gene *HMA1*. The
 337 resulting strain, Cd2115, was impaired in chlamydospore and pseudohyphae formation. However,
 338 Hma1 was found not to be a transcription factor, but instead showed highest similarities with the
 339 *S. cerevisiae* tRNA threonylcarbamoyladenine dehydratase Tcd2. Interestingly, a previous large
 340 scale screening in *S. cerevisiae* revealed that overexpression of *TCD2* increased invasive and
 341 pseudohyphal growth on nitrogen-sufficient medium (46), a phenotype that is very similar to that of
 342 *C. albicans hma1Δ/Δ* deletion mutants.

343 **Wide-ranging consequences of t⁶A modifications**

344 The importance of tRNA modifications for cellular processes has been extensively studied in humans,
 345 as many genetic diseases, including cancer, diabetes, and several neuropathies are caused by
 346 improper tRNA modifications (47), yet the effector mechanisms are still often poorly understood.
 347 Miyauchi *et al.* discovered the cyclic t⁶A tRNA modification at position 37 in 2013 and showed its
 348 unexpected wide prevalence in bacteria, fungi and plants (12). Further investigations into the
 349 condensed compound ct⁶A are lacking, but the structural and steric similarities to the t⁶A precursor
 350 molecule allow some functional assumptions. The t⁶A modification is one of the few conserved tRNA
 351 modifications which occur in all domains of life, and defects in its synthesis pathway are lethal in
 352 many prokaryotes (48), including the pathogens *Mycoplasma pulmonis* (49), *Salmonella* Typhi (50),
 353 and *Staphylococcus aureus* (51). In fact, strategies to target t⁶A-biosynthesis for antibiotic therapy
 354 have been considered (10). Indispensability of t⁶A-related genes is however not strictly conserved
 355 within bacteria, and some species like *Deinococcus radiodurans* which use a yeast-typical tRNA
 356 charging system can tolerate t⁶A defects (13, 52). Therefore, the t⁶A-independency of eukaryotic
 357 isoleucyl tRNA synthetases would be one explanation for the viability of t⁶A- and ct⁶A-biosynthesis
 358 defective mutants in *S. cerevisiae* (12, 53) which was reflected by our observed lack of severe growth
 359 defects of *hma1Δ/Δ* mutants in *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

360 In *S. cerevisiae*, Tcd2 is associated with the KEOPS complex, and knockout mutants of members of
 361 this complex are blocked or diminished in t⁶A formation (53). Threonine, in addition to carbonate and
 362 ATP, is a substrate in the initial steps of t⁶A formation, and availability of threonine is thus a
 363 determinant of t⁶A modification levels (10). Supplementation with L-homoserine, an isomer of
 364 threonine, consequently increased the growth rates of both *S. cerevisiae tcs2Δ* and *C. albicans*
 365 *hma1Δ/Δ* mutants even beyond their parental strains (7). Prominent phenotypes of ct⁶A-defective
 366 *S. cerevisiae tcd2Δ* mutants include an elevated sensitivity to heat stress (37 °C) (54) and the inability
 367 to use non-fermentable carbon sources (12, 55). As recently shown, the connection between heat
 368 resistance and tRNA modification differs among yeast species depending on their evolutionary
 369 history and ecological niche (56), but the effect was observable in the *Candida hma1Δ/Δ* deletion
 370 mutants, with evident consequences for infections of endothermic hosts. Baker's yeast and Crabtree-
 371 negative *Candida* species however differ in their primary carbon catabolism (57), and we
 372 consequently observed no correlation of ct⁶A formation and respiratory growth ability for the latter.
 373 Finally, levels of many tRNA modifications are considered possible internal markers for exposure to
 374 cellular stressors (14, 58). We however did not see any growth variations for *C. albicans hma1Δ/Δ*
 375 mutants in the presence of osmotic, oxidative, or DNA damaging stressors. This suggests that Hma1
 376 is not relevant for the global stress response.

377 378 **tRNA modification levels affect the TOR pathway and influence morphology**

379 TOR signaling directs complex cellular networks depending on nutrient availability (59). The link
 380 between TOR pathway and tRNA-modifications like t⁶A is conserved throughout the eukaryota: A loss
 381 of modifications at the ASL decreases rapamycin resistance in *S. cerevisiae* (60, 61), KEOPS complex
 382 mutants in *Drosophila* resemble TOR pathway-deficient mutants (62), disturbance of tRNA-modifying
 383 enzymes reduce the TOR-driven cell growth in *Arabidopsis thaliana* (63), and a hypomodified
 384 adenosine residue at position 37 of tRNAs is considered a risk factor for type 2 diabetes as a
 385 consequence of mTOR overactivation in humans (64) (65). Interestingly, only the *C. dubliniensis*
 386 *Cdhma1Δ/Δ* and *S. cerevisiae tcd1Δ* and *tcd2Δ* mutants share the feature of a reduced rapamycin
 387 resistance to their parental strains (12). In *C. albicans*, the *hma1Δ/Δ* gene deletion enhanced
 388 resistance to TOR-antagonistic substances. Hence, Hma1 acts – in interplay with the TOR-pathway –
 389 in a species-specific manner.

390 In addition to the conserved TOR functions, reduced Tor1 activity also contributes to *C. albicans*
 391 yeast-to-hyphae transition via nucleosome repositioning that allows expression of hyphae-associated
 392 genes (66), and we investigated the role of Hma1 in polymorphism. A function in morphological
 393 transitions was hinted at by the integration of *C. albicans HMA1* into *C. dubliniensis*, which changed
 394 its morphology under nitrogen and amino acid deficiency. This parallels a similar role of tRNA
 395 modifications in thiolation-deficient *S. cerevisiae uba4Δ* mutants which do not filament on SLAD agar
 396 (17). Further deletions of *hma1Δ/Δ* in *C. albicans* led to a severe decrease in hyphae length and
 397 invasiveness into oral epithelial cells. Interestingly, this effect was species-specific, as *C. dubliniensis*
 398 *Cdhma1Δ/Δ* mutants formed unaltered hyphae on solid media and even longer filaments in presence
 399 of serum. The involvement of Tor1 in the filamentation response of *C. albicans* is known to depend
 400 on the medium used. On (semi-) solid media under nutrient restrictions, TOR pathway activity can
 401 increase the hyphae formation of *C. albicans* (32). In contrast, in liquid medium, Tor1 activity
 402 supports growth as yeasts of both *C. albicans* and *C. dubliniensis*, but hyphae elongation can be
 403 enhanced by supplementation with rapamycin (28, 66, 67) .

404 How does Hma1 compare to these Tor1 effects? In our experiments with *C. albicans*, presence of the
 405 *HMA1* gene was required for formation of a hyphal colony fringe specifically on nutrient-rich agar,
 406 where rapamycin is known to have no effect (32). In contrast, on nutrient-poor media the colony
 407 morphology was independent of Hma1 but is strongly affected by Tor1 repression (32). Furthermore,
 408 the central wrinkling was always unaffected in *hma1Δ/Δ* strains, while at least on nutrient poor
 409 media, Tor1 repression abolishes these wrinkles. Overall, *C. albicans* Hma1 seems to be required

410 under conditions where Tor1 activity is dispensable for hyphal growth, namely in presence of
411 sufficient nutrients. We therefore predict opposing roles for Tor1 and Hma1-mediated ct⁶A
412 modification in *C. albicans*. Interestingly, in *C. dubliniensis* *Cdhma1Δ/Δ* mutants, both the effect on
413 rapamycin resistance and on hyphae formation was reversed compared to *C. albicans* *HMA1*
414 deletion. This further hints toward an evolutionary rewiring between Hma1 and TOR pathway
415 activity.

416 . Specific changes in filamentation and Hma1 defects correlates in both *C. dubliniensis* and *C. albicans*
417 *hma1Δ/Δ* mutants. *In silico* analyses of ANN-enriched genes, which would possibly be most affected
418 by loss of Hma1, identified a number of common and some specific hyphae-associated genes in both
419 species. Among the transcription factors specifically enriched for ANN in *C. dubliniensis* we found
420 *CdUME6* and *CdSFL2*, two genes known for their species-specific regulation of filamentation. Low
421 *CdUME6* gene expression prevents hyphae formation of *C. dubliniensis* (26) in nutrient-rich media
422 even in presence of serum where *UME6* expressing *C. albicans* readily filaments. Similarly, in an
423 inducible mutant, *CdSFL2* gene expression levels correlated with filamentation in *C. dubliniensis* (39).
424 The efficiency of translation of these factors – dependent on the tRNA modification state – may thus
425 play a role in the morphological differences between the two species.

426 In fact, overexpression of the *HMA1* ortholog *TCD2* in *S. cerevisiae* is known to result in enhanced
427 pseudohyphal growth as well as increased invasion into nitrogen-sufficient agar (46). Similarly, the
428 reduced hyphae length of *C. albicans* *hma1Δ/Δ* was accompanied with impaired invasiveness on agar
429 plates and, importantly, on human epithelium, a phenotype that is linked to general virulence
430 potential (68).

431 A connection between tRNA modification and morphology is also known in other contexts: low
432 modification levels at the tRNA wobble antibase in *S. cerevisiae* exhibit similar defects in starvation-
433 induced agar invasion (69), and genes coding for tRNA modifying enzymes (*UBA4*, *URM1*, *NCS2*,
434 *NCS6*) were enriched in a systematic screening of *S. cerevisiae* deletion mutants with altered colony
435 morphology on solid agar. The integrity of tRNA modifications can affect development of
436 morphological structures in other organisms, from filamentous morphologies in *Salmonella* (70) to
437 alterations in the auxin-regulated morphogenesis in *Arabidopsis* (71).
438

439 **tRNA modifications are required for full virulence**

440 In most bacteria a defect in t⁶A modification is lethal (13), and modifications that target the tRNA
441 wobble bases are known to be essential for virulence of gram-negative bacteria like *Pseudomonas*
442 *aeruginosa* (72). In *Samonella* Typhimurium, disrupted tRNA modification reduces expression of
443 flagellar and secretion type III-genes (70). Little is known on the role of tRNA modifications for fungal
444 pathogenesis, but the plant pathogen *Colletotrichum lagenarium* failed to penetrate host tissue after
445 defects in 7-methylguanosine formation (73) – a phenotype somewhat analogous to our *C. albicans*
446 *hma1Δ/Δ* mutants. In our case, the reduced adhesion and invasion properties during infection of
447 human oral epithelia hinted toward the possibility of a general virulence defect.

448 We hence used an alternative infection model to test the virulence potential of our tRNA
449 modification-defective mutants: embryonated chicken eggs, a model which is known to correlate
450 well with mice infections and which is suitable to predict progress of infection in mammals (74). In
451 this avian model infection with Hma1-defective strains resulted in a significantly reduced mortality
452 rate, supporting our idea of a role for tRNA modifications for fully expressing *Candida* virulence
453 attributes.

454 Interestingly, our *in silico* analyses showed Hma1 to be fungal-specific without a human ortholog and
455 therefore, tRNA modifying enzymes could potentially serve as future antibiotic targets.

456

457 **Conclusion**

458 So far, tRNA modifications have not been implicated, to our knowledge, in the virulence potential
 459 and morphogenesis of human fungal pathogens. Based on our data, we propose a model (figure 9)
 460 where the interplay of ct⁶A tRNA modification levels and TOR pathway activity influence the
 461 filamentation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* via a common route, but with species-specific
 462 outcomes. Central in this model is the tRNA modifying enzyme Hma1 that effects especially ANN
 463 codon-rich transcripts and thereby influences the translation fidelity and efficiency of many
 464 transcription factors relevant for hyphae formation and expression of pathogenicity-associated
 465 genes. Together with the output of the Tor1-dependent arm, the combined effect has a strong
 466 impact on morphogenesis, invasion, and in consequence virulence of *C. albicans*, linking tRNA
 467 modifications to fungal infectious disease.

468 **Materials and Methods**469 **Strains and culture conditions**

470 *Candida* strains were routinely propagated on YPD agar (20 g peptone, 10 g yeast extract, 20 g
 471 glucose, 15 g agar per liter) at 30°C and stored as frozen stocks in YPD medium with 15% (vol/vol)
 472 glycerol at -80°C. *Candida* strains used in this work are listed in Table 1.

473 **Morphological tests**474 *Chlamydospore formation*

475 Chlamydospore production by *C. dubliniensis* was induced on solid synthetic low-ammonium-
 476 dextrose (SLAD)-agar (0.17% Yeast Nitrogen base without Amino Acids and Ammonium Sulfate; BD,
 477 Heidelberg, Germany) (75) without any additional nitrogen source but with 2% glucose and 2% agar
 478 (Kobe I, Carl Roth GmbH + Co. KG, Germany). Formation of chlamydospores by *C. albicans* was
 479 induced on corn meal-Tween 80 agar (BD, Heidelberg, Germany). The plates were incubated at 28°C
 480 for 2-7 d in darkness, and chlamydospore formation was monitored microscopically (Axiovert, Zeiss,
 481 Germany).

482 *Germ tube assays*

483 For hyphae induction in liquid media, *Candida* strains were pre-grown in liquid YPD overnight (30°C,
 484 180 rpm), washed with ddH₂O, and 10⁵ cells were transferred into 500 µl of one of the following
 485 filament-inducing media: Spider medium (1% mannitol; 1% nutrient broth; 0.2% K₂HPO₄, pH 7.2), H₂O
 486 plus 10% (vol/vol) fetal calf serum, DMEM medium, or DMEM medium plus 10% (vol/vol) fetal calf
 487 serum. Cultures were grown four hours at 37°C with 5% CO₂, and the morphology was analyzed
 488 microscopically (Axiovert, Zeiss, Germany).

489 *Filamentation assay*

490 *Candida* cells from YPD overnight cultures were washed and 5 µl of 2×10⁷ cells/ml were spotted on
 491 the following agar plates: YPD, Spider, water agar, SLAD, or boiled blood (chocolate) agar (76). Colony
 492 filamentation was investigated after incubation at 30°C or at 37°C in either atmospheric or 5% CO₂-
 493 enriched air after three and seven days incubation, using a binocular (Stemi 2000-C, Zeiss, Germany).

494 **Stress assays**

495 Resistance of *Candida* strains to stressors was tested by growth curve assays and serial drop dilution
 496 tests on solid agar plates. In both cases *Candida* cells from YPD overnight cultures (30°C, 180 rpm)
 497 were initially washed once with water. For growth rates cells were diluted to OD₆₀₀ = 0.01 in YPD or
 498 SD medium with indicated concentrations of supplements (rapamycin, caffeine, or L-homoserine; all
 499 from Sigma-Aldrich GmbH, Germany). Cultures were incubated at 30°C in 96-well plates a Magellan
 500 TECAN plate reader and OD₆₀₀ was determined after 30 s shaking every 15 min over 48 h. For drop
 501 dilution tests, *Candida* cultures were adjusted to 2×10⁸ cells/ml and successively diluted by factor 10.
 502 5 µl of each concentration was dropped onto solid agar plates and colony growth was followed for

508 two or three days under the indicated conditions. Photos were taken with an imaging system (Vilber-
509 Lourmat GmbH, Germany).

510

511 **Adhesion/invasion assay**

512 The capability of *C. albicans* cells to adhere and invade host cell layers was assayed by infecting
513 monolayers of human oral epithelial TR146. Cell cultivation, infection and fixation procedures were
514 performed as previously described (68) using a MOI of 0.4. Three hours post infection non-adherent
515 cells were rinsed with PBS and samples were fixed with Histofix (Carl Roth GmbH + Co. KG, Germany).
516 Adherent *Candida* cells on the epithelium were marked with primary anti-*Candida* antibody (Acris
517 Anti *Candida*, rabbit, Herford, Germany) and detected with an Alexa Fluor 488-coupled secondary
518 anti-rabbit antibody. Subsequent permeabilization of the TR146 cells with 0.5% Triton X-100 allowed
519 staining of invasive hyphae parts with Calcofluor White (Sigma-Aldrich GmbH, Germany). Hyphal
520 length and invasiveness was determined for 100 hyphae of each strain in triplicates using fluorescence
521 microscopy (Zen2 pro, Zeiss, Germany).

522

523 **Screening of a *C. albicans* genomic library and identification of the *C. albicans* genomic fragments 524 inserted in *C. dubliniensis***

525 The construction of a genomic *C. albicans* library in *C. dubliniensis* was described before by Staib and
526 Morschhäuser (25). Approximately 20,000 library clones were screened on SLAD agar under
527 chlamydospore-inducing conditions, and colonies with altered colony morphology were confirmed
528 on SLAD-agar. The *C. albicans*-derived DNA fragment from the transformant CdInt2 was amplified
529 and sequenced using the primers CdUra14 and M13rev. Sequence analysis demonstrated that
530 CdINT2 contained *C. albicans* sequences corresponding to chromosomal coordinates 22964-27892 of
531 chromosome 2. Three complete *C. albicans* ORFs, *orf19.2113*, *orf19.2114* and *orf19.2115* are located
532 within this region. Each ORF including native promoter and terminator regions was amplified via PCR
533 using the corresponding primer pairs (IF2113_1/2; IF2114_1/2, IF2115_1/2) and cloned into
534 *Apal/XhoI*-cut plasmid pcdINT1 using the InFusion cloning kit (Takara Bio Company©). The resulting
535 plasmids were transformed (see *Candida* transformant construction) into *C. dubliniensis* CdUM4A
536 (77) and their morphology investigated.

537

538 **Plasmid construction**

539 The deletion cassette for *orf19.2115* was constructed as follows: An *Apal-XhoI* fragment with
540 *orf19.2115* upstream sequences was cloned after amplification by PCR with the primers 2115_3 and
541 2115_4 (Table S1) using genomic DNA from *C. albicans* SC5314 as template. A *SacII-SacI* fragment
542 containing *orf19.2115* downstream sequences was obtained with the primers 2115_5 and 2115_6.
543 These *orf19.2115* upstream and downstream fragments were used to replace *SSU2* upstream and
544 downstream fragments in plasmid pSSU2M2 (78) via the introduced restriction sites, to result in
545 p2115M2, in which the *SAT1* flipper cassette is flanked by *orf19.2115* sequences. The gene deletion
546 cassette pcd15150M2 for *CD36_15150* in *C. dubliniensis* was constructed analogously using the
547 primer pairs 15150_3 and 15150_4 or 15150_5 and 15150_6, respectively with gDNA from
548 *C. dubliniensis* Wü284 as template.

549 The *orf19.2115* gene was amplified for genetic reconstitution in *C. albicans* using the primers 2115_3
550 and 2115_7. The *Apal/BamHI*-cut DNA fragment was integrated into pSAP2KS1 (79) resulting in
551 p2115KS1. The *orf19.2115* downstream DNA fragment was amplified using the primers 2115_8 and
552 2115_9 and the *NotI/SacII*-cut DNA fragment was ligated into p2115KS1. For the *CD36_15150*
553 revertant in *C. dubliniensis* the whole *CD36_15150* gene was amplified using the primer pair 15150_3
554 and 15150_7, and the downstream DNA fragment using the primers 15150_5 and 15150_6c. The
555 *Apal/SmaI*- or *SacII/SacI*-cut fragments were integrated into pSAP2KS1.

556

557 ***Candida* transformant construction**

558 Chemically competent *C. albicans* or *C. dubliniensis* cells were transformed with linear DNA
559 fragments by heat shock at 44 °C (80, 81), and resulting clones were selected on YPD plates

560 containing 50-200 µg/ml nourseothricin (Werner Bioagents, Jena, Germany). The SAT1 flipper
561 strategy allows the recycling of the selection marker (82). The insertion locus of the DNA fragment
562 was confirmed by Southern Blot analyses.

563

564 **Southern Blot**

565 10 µg of isolated genomic DNA was digested with an appropriate restriction enzyme. After DNA
566 separation on an agarose gel (1%), DNA was transferred onto a nylon membrane using a vacuum blot
567 system. UV-linked DNA was hybridized with chemiluminescence-enabled probes and detected via the
568 Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection (GE Healthcare, Braunschweig, Germany)
569 according to the manufacturer's instructions (Fig. S1).

570

571 **Growth curve analyses**

572 Resistances against certain stressors were evaluated via growth curve assays. Strains were pre-grown
573 overnight in YPD medium at 30°C and 180 rpm shaking. After repeated washing, cells were diluted to
574 $OD_{600} = 0.01$ and inoculated into 200 µl of the indicated medium. YPD served as standard media and
575 stressor or nutrients were added as indicated. Growth in synthetic minimal media was monitored in
576 SD (Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate, MP, Santa Ana, CA, USA) or YCB-medium (Yeast
577 Carbon Base, BD, Heidelberg, Germany). Cultures were incubated in a 96-well plate at 30°C in a
578 Magellan TECAN plate reader with 30 s shaking prior to determination of extinction in the wells at
579 600 nm every 30 min over 48 h.

580

581 **Prediction of ANN-enriched genes in *C. albicans***

582 Genes from the *C. albicans* SC5314 genome assembly 22 and *C. dubliniensis* CD36
583 (<http://www.candidagenome.org>) were analyzed according to their abundance of ANN-codon
584 clusters (i.e. directly adjacent ANN codons). The cluster score equals the sum of the squares of the
585 length of these clusters. The normalized cluster score is the same value, but normalized to the
586 respective gene size.

587

$$588 \text{ Normalized Cluster Score} = \frac{\sum \text{Lengths of ANN codon stretches}^2}{\text{Gene length in bp}} \quad (1)$$

589

590 **Chicken embryo infection model**

591 The embryonated chicken infection model was used to study virulence as described previously (40).
592 Briefly, overnight cultures of yeasts were washed with PBS and adjusted to 10^8 cells/ml or 10^6
593 cells/ml. A high (10^7 yeasts/egg) or low inoculum (10^5 yeasts/egg) was applied onto the chorio-
594 allantoic membrane at developmental day 10 via an artificial air chamber. In each experiment, the
595 viability of 20 eggs per group (*Candida* or PBS control) was evaluated for 7 days by daily candling.
596 Experiments were performed in duplicate. Surviving embryos were humanely terminated by chilling
597 on ice at the end of the experiment. All experiments were performed in compliance with the German
598 animal protection law. According to this, no specific approval is needed for work performed in avian
599 embryos before the time of hatching. All experiments were terminated latest on developmental day
600 18.

601

602 **Acknowledgements**

603 We thank the Bernhard Hube and Selene Mogavero for scientific guidance, Joachim Morschhäuser
604 for sharing the *Candida* genomic libraries and all technical and student assistants for practical
605 support. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft project STA 1147/1-1
606 and CRC/Transregio 124 'Pathogenic fungi and their human host: Networks of interaction'
607 subprojects C2 and C5.

608 **References**

- 609 1. Lamichhane TN, Blewett NH, Crawford AK, Cherkasova VA, Iben JR, Begley TJ, et al. Lack of
610 tRNA modification isopentenyl-A37 alters mRNA decoding and causes metabolic deficiencies in
611 fission yeast. *Mol Cell Biol*. 2013;33(15):2918-29.
- 612 2. Gu C, Begley TJ, Dedon PC. tRNA modifications regulate translation during cellular stress.
613 *FEBS Lett*. 2014;588(23):4287-96.
- 614 3. Phizicky EM, Hopper AK. tRNA processing, modification, and subcellular dynamics: past,
615 present, and future. *RNA*. 2015;21(4):483-5.
- 616 4. Hopper AK, Phizicky EM. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev*. 2003;17(2):162-80.
- 617 5. Shigi N. Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Front Genet*. 2014;5:67.
- 618 6. Srinivasan M, Mehta P, Yu Y, Prugar E, Koonin EV, Karzai AW, et al. The highly conserved
619 KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *EMBO J*. 2011;30(5):873-81.
- 620 7. Thiaville PC, Legendre R, Rojas-Benitez D, Baudin-Baillieu A, Hatin I, Chalancon G, et al. Global
621 translational impacts of the loss of the tRNA modification tA in yeast. *Microb Cell*. 2016;3(1):29-45.
- 622 8. Grosjean H, de Crecy-Lagard V, Marck C. Deciphering synonymous codons in the three
623 domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett*. 2010;584(2):252-
624 64.
- 625 9. Konevega AL, Soboleva NG, Makhno VI, Semenov YP, Wintermeyer W, Rodnina MV, et al.
626 Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by
627 stacking and Mg²⁺-dependent interactions. *RNA*. 2004;10(1):90-101.
- 628 10. Deutsch C, El Yacoubi B, de Crecy-Lagard V, Iwata-Reuyl D. Biosynthesis of threonylcarbamoyl
629 adenosine (t6A), a universal tRNA nucleoside. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13666-73.
- 630 11. Elkins BN, Keller EB. The enzymatic synthesis of N-(purin-6-ylcarbamoyl)threonine, an
631 anticodon-adjacent base in transfer ribonucleic acid. *Biochemistry*. 1974;13(22):4622-8.
- 632 12. Miyauchi K, Kimura S, Suzuki T. A cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenine as a widely
633 distributed tRNA hypermodification. *Nat Chem Biol*. 2013;9(2):105-11.
- 634 13. Thiaville PC, El Yacoubi B, Kohrer C, Thiaville JJ, Deutsch C, Iwata-Reuyl D, et al. Essentiality of
635 threonylcarbamoyladenine (t⁶A), a universal tRNA modification, in bacteria. *Mol Microbiol*. 2015.
- 636 14. Chan CT, Deng W, Li F, DeMott MS, Babu IR, Begley TJ, et al. Highly Predictive
637 Reprogramming of tRNA Modifications Is Linked to Selective Expression of Codon-Biased Genes.
638 *Chem Res Toxicol*. 2015;28(5):978-88.
- 639 15. Zaborske JM, Narasimhan J, Jiang L, Wek SA, Dittmar KA, Freimoser F, et al. Genome-wide
640 analysis of tRNA charging and activation of the eIF2 kinase Gcn2p. *J Biol Chem*. 2009;284(37):25254-
641 67.
- 642 16. Lin CA, Ellis SR, True HL. The Sua5 protein is essential for normal translational regulation in
643 yeast. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):354-63.
- 644 17. Laxman S, Tu BP. Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-
645 dependent cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2011;6(10):e26081.
- 646 18. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial
647 bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide
648 surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309-17.
- 649 19. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al.
650 Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from

- 651 population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.*
 652 2005;43(4):1829-35.
- 653 20. Khan Z, Ahmad S, Joseph L, Chandy R. *Candida dubliniensis*: an appraisal of its clinical
 654 significance as a bloodstream pathogen. *PLoS One.* 2012;7(3):e32952.
- 655 21. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin*
 656 *Microbiol.* 1998;36(2):329-34.
- 657 22. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, et al. Comparative
 658 genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.*
 659 2009;19(12):2231-44.
- 660 23. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C.*
 661 *albicans* More Pathogenic? *Int J Microbiol.* 2012;2012:205921.
- 662 24. Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific
 663 characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses.* 1999;42(9-10):521-4.
- 664 25. Staib P, Morschhäuser J. Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-
 665 specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
 666 *Molecular microbiology.* 2005;55(2):637-52.
- 667 26. O'Connor L, Caplice N, Coleman DC, Sullivan DJ, Moran GP. Differential filamentation of
 668 *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Is governed by nutrient regulation of *UME6* expression.
 669 *Eukaryot Cell.* 2010;9(9):1383-97.
- 670 27. Caplice N, Moran GP. *Candida albicans* exhibits enhanced alkaline and temperature induction
 671 of Efg1-regulated transcripts relative to *Candida dubliniensis*. *Genom Data.* 2015;6:130-5.
- 672 28. Sullivan DJ, Moran GP. Differential virulence of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*: A role
 673 for Tor1 kinase? *Virulence.* 2011;2(1):77-81.
- 674 29. Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates
 675 of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal*
 676 *Genet Biol.* 2007;44(9):920-31.
- 677 30. Böttcher B, Palige K, Jacobsen ID, Hube B, Brunke S. Csr1/Zap1 Maintains Zinc Homeostasis
 678 and Influences Virulence in *Candida dubliniensis* but Is Not Coupled to Morphogenesis. *Eukaryot Cell.*
 679 2015;14(7):661-70.
- 680 31. Böttcher B, Pöllath C, Staib P, Hube B, Brunke S. *Candida* species Rewired Hyphae
 681 Developmental Programs for Chlamydospore Formation. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7:1697.
- 682 32. Bastidas RJ, Heitman J, Cardenas ME. The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene
 683 expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000294.
- 684 33. Palige K, Linde J, Martin R, Böttcher B, Citiulo F, Sullivan DJ, et al. Global transcriptome
 685 sequencing identifies chlamydospore specific markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
 686 *PLoS One.* 2013;8(4):e61940.
- 687 34. Takahara T, Maeda T. Evolutionarily conserved regulation of TOR signalling. *J Biochem.*
 688 2013;154(1):1-10.
- 689 35. Damon JR, Pincus D, Ploegh HL. tRNA thiolation links translation to stress responses in
 690 *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2015;26(2):270-82.
- 691 36. Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to
 692 *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 2005;7(11):1546-54.
- 693 37. Jüdes A, Bruch A, Klassen R, Helm M, Schaffrath R. Sulfur transfer and activation by ubiquitin-
 694 like modifier system Uba4•Urm1 link protein urmylation and tRNA thiolation in yeast. *Microbial Cell.*
 695 2016;3(11):554-64.
- 696 38. Finkel JS, Xu W, Huang D, Hill EM, Desai JV, Woolford CA, et al. Portrait of *Candida albicans*
 697 adherence regulators. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002525.
- 698 39. Spiering MJ, Moran GP, Chauvel M, Maccallum DM, Higgins J, Hokamp K, et al. Comparative
 699 transcript profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* identifies *SFL2*, a *C. albicans* gene
 700 required for virulence in a reconstituted epithelial infection model. *Eukaryot Cell.* 2010;9(2):251-65.

- 701 40. Jacobsen ID, Grosse K, Berndt A, Hube B. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the
 702 alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections.
 703 PLoS One. 2011;6(5):e19741.
- 704 41. Boero F. From Darwin's Origin of Species toward a theory of natural history. F1000Prime Rep.
 705 2015;7:49.
- 706 42. Majerczyk CD, Brittnacher MJ, Jacobs MA, Armour CD, Radey MC, Bunt R, et al. Cross-species
 707 comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei*
 708 quorum-sensing regulons. J Bacteriol. 2014;196(22):3862-71.
- 709 43. Grumaz C, Lorenz S, Stevens P, Lindemann E, Schock U, Retey J, et al. Species and condition
 710 specific adaptation of the transcriptional landscapes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
 711 BMC Genomics. 2013;14:212.
- 712 44. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, et al. Candidalysin is a
 713 fungal peptide toxin critical for mucosal infection. Nature. 2016;532(7597):64-8.
- 714 45. Al Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida*
 715 *albicans* on Pal's agar. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4787-9.
- 716 46. Shively CA, Eckwahl MJ, Dobry CJ, Mellacheruvu D, Nesvizhskii A, Kumar A. Genetic networks
 717 inducing invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* identified through systematic genome-wide
 718 overexpression. Genetics. 2013;193(4):1297-310.
- 719 47. Torres AG, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases.
 720 Trends Mol Med. 2014;20(6):306-14.
- 721 48. El Yacoubi B, Hatin I, Deutsch C, Kahveci T, Rousset JP, Iwata-Reuyl D, et al. A role for the
 722 universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. EMBO J. 2011;30(5):882-93.
- 723 49. French CT, Lao P, Loraine AE, Matthews BT, Yu H, Dybvig K. Large-scale transposon
 724 mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. Mol Microbiol. 2008;69(1):67-76.
- 725 50. Langridge GC, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, Haase J, et al. Simultaneous assay of
 726 every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. Genome Res. 2009;19(12):2308-
 727 16.
- 728 51. Chaudhuri RR, Allen AG, Owen PJ, Shalom G, Stone K, Harrison M, et al. Comprehensive
 729 identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential
 730 Hybridisation (TMDH). BMC Genomics. 2009;10:291.
- 731 52. Onodera T, Satoh K, Ohta T, Narumi I. *Deinococcus radiodurans* YgjD and YeaZ are involved in
 732 the repair of DNA cross-links. Extremophiles. 2013;17(1):171-9.
- 733 53. Thiaville PC, Iwata-Reuyl D, de Crecy-Lagard V. Diversity of the biosynthesis pathway for
 734 threonylcarbamoyladenine (t(6)A), a universal modification of tRNA. RNA Biol. 2014;11(12):1529-
 735 39.
- 736 54. Sinha H, David L, Pascon RC, Clauder-Munster S, Krishnakumar S, Nguyen M, et al. Sequential
 737 elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-
 738 temperature growth in yeast. Genetics. 2008;180(3):1661-70.
- 739 55. Qian W, Ma D, Xiao C, Wang Z, Zhang J. The genomic landscape and evolutionary resolution
 740 of antagonistic pleiotropy in yeast. Cell Rep. 2012;2(5):1399-410.
- 741 56. Alings F, Sarin LP, Fufezan C, Drexler HC, Leidel SA. An evolutionary approach uncovers a
 742 diverse response of tRNA 2-thiolation to elevated temperatures in yeast. RNA. 2015;21(2):202-12.
- 743 57. Askew C, Sellam A, Epp E, Hogues H, Mullick A, Nantel A, et al. Transcriptional regulation of
 744 carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. PLoS Pathog.
 745 2009;5(10):e1000612.
- 746 58. Dedon PC, Begley TJ. A system of RNA modifications and biased codon use controls cellular
 747 stress response at the level of translation. Chem Res Toxicol. 2014;27(3):330-7.
- 748 59. Loewith R, Hall MN. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control.
 749 Genetics. 2011;189(4):1177-201.
- 750 60. Rojas-Benitez D, Thiaville PC, de Crecy-Lagard V, Glavic A. The Levels of a Universally
 751 Conserved tRNA Modification Regulate Cell Growth. J Biol Chem. 2015;290(30):18699-707.

- 752 61. Klassen R, Grunewald P, Thuring KL, Eichler C, Helm M, Schaffrath R. Loss of anticodon
753 wobble uridine modifications affects tRNA(Lys) function and protein levels in *Saccharomyces*
754 *cerevisiae*. PLoS One. 2015;10(3):e0119261.
- 755 62. Rojas-Benitez D, Ibar C, Glavic A. The *Drosophila* EKC/KEOPS complex: roles in protein
756 synthesis homeostasis and animal growth. Fly (Austin). 2013;7(3):168-72.
- 757 63. Leiber R-M, John F, Verhertbruggen Y, Diet A, Knox JP, Ringli C. The TOR Pathway Modulates
758 the Structure of Cell Walls in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 2010;22(6):1898-908.
- 759 64. Blagosklonny M. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications:
760 perspective for endocrinologists and gerontologists. Cell death & disease. 2013;4(12):e964.
- 761 65. Wei F-Y, Tomizawa K. Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes
762 the development of type 2 diabetes [Review]. Endocrine Journal. 2011;58(10):819-25.
- 763 66. Lu Y, Su C, Liu H. A GATA transcription factor recruits Hda1 in response to reduced Tor1
764 signaling to establish a hyphal chromatin state in *Candida albicans*. PLoS Pathog.
765 2012;8(4):e1002663.
- 766 67. Su C, Lu Y, Liu H. Reduced TOR signaling sustains hyphal development in *Candida albicans* by
767 lowering Hog1 basal activity. Mol Biol Cell. 2013;24(3):385-97.
- 768 68. Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Forster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-
769 epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host
770 factors on the infection process. PLoS One. 2012;7(5):e36952.
- 771 69. Goehring AS, Rivers DM, Sprague GF, Jr. Urmylation: a ubiquitin-like pathway that functions
772 during invasive growth and budding in yeast. Mol Biol Cell. 2003;14(11):4329-41.
- 773 70. Shippy DC, Heintz JA, Albrecht RM, Eakley NM, Chopra AK, Fadl AA. Deletion of glucose-
774 inhibited division (*gidA*) gene alters the morphological and replication characteristics of *Salmonella*
775 *enterica* Serovar typhimurium. Arch Microbiol. 2012;194(6):405-12.
- 776 71. Leitner J, Retzer K, Malenica N, Bartkeviciute R, Lucyshyn D, Jager G, et al. Meta-regulation of
777 *Arabidopsis* auxin responses depends on tRNA maturation. Cell Rep. 2015;11(4):516-26.
- 778 72. Gupta R, Gobble TR, Schuster M. *GidA* posttranscriptionally regulates rhl quorum sensing in
779 *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2009;191(18):5785-92.
- 780 73. Takano Y, Takayanagi N, Hori H, Ikeuchi Y, Suzuki T, Kimura A, et al. A gene involved in
781 modifying transfer RNA is required for fungal pathogenicity and stress tolerance of *Colletotrichum*
782 *lagenarium*. Mol Microbiol. 2006;60(1):81-92.
- 783 74. Jacobsen ID, Grosse K, Hube B. Embryonated chicken eggs as alternative infection model for
784 pathogenic fungi. Methods Mol Biol. 2012;845:487-96.
- 785 75. Biswas K, Morschhäuser J. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-
786 induced filamentous growth in *Candida albicans*. Molecular microbiology. 2005;56(3):649-69.
- 787 76. Sheth CC, Johnson E, Baker ME, Haynes K, Muhlschlegel FA. Phenotypic identification of
788 *Candida albicans* by growth on chocolate agar. Med Mycol. 2005;43(8):735-8.
- 789 77. Staib P, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhäuser J. Isogenic strain construction and
790 gene targeting in *Candida dubliniensis*. J Bacteriol. 2001;183(9):2859-65.
- 791 78. Hennicke F, Grumbt M, Lermann U, Ueberschaar N, Palige K, Bottcher B, et al. Factors
792 supporting cysteine tolerance and sulfite production in *Candida albicans*. Eukaryot Cell.
793 2013;12(4):604-13.
- 794 79. Staib P, Lermann U, Blass-Warmuth J, Degel B, Wurzner R, Monod M, et al. Tetracycline-
795 inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-
796 specific inhibitor screening. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(1):146-56.
- 797 80. Kohler GA, White TC, Agabian N. Overexpression of a cloned *IMP* dehydrogenase gene of
798 *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. Journal of
799 bacteriology. 1997;179(7):2331-8.
- 800 81. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases
801 autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene. 1987;57(2-3):267-72.
- 802 82. Reuss O, Vik A, Kolter R, Morschhäuser J. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene
803 disruption in *Candida albicans*. Gene. 2004;341:119-27.

- 804 83. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-
 805 phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. Mol
 806 Gen Genet. 1984;198(2):179-82.
 807 84. Morschhäuser J, Ruhnke M, Michel S, Hacker J. Identification of CARE-2-negative *Candida*
 808 *albicans* isolates as *Candida dubliniensis*. Mycoses. 1999;42(1-2):29-32.

809

810 **Tables**

811 **Table 1** *Candida* strains used in this study

Strain	Parent	Genotype	Reference
SC5314	<i>C. albicans</i> wild-type strain		(83)
CaCSP1-GFP	SC5314	<i>orf19.3512/orf19.3512-GFP-T_{ACT1}</i>	(33)
<i>HMA1/SAT1</i> A/B	SC5314	<i>orf19.2115Δ::SAT1-FLIP/ ORF19.2115</i>	This study
<i>HMA1/hma1Δ</i> A/B	<i>HMA1/SAT1</i> A/B	<i>orf19.2115Δ::FRT/ ORF19.2115</i>	This study
<i>hma1Δ/SAT1</i> A/B	<i>HMA1/hma1Δ</i> A/B	<i>orf19.2115Δ::FRT/ orf19.2115Δ::SAT1-FLIP</i>	This study
<i>hma1Δ/Δ</i> A/B	<i>hma1Δ/SAT1</i> A/B	<i>orf19.2115Δ::FRT/ orf19.2115Δ::FRT</i>	This study
<i>HMA1KS1</i>	<i>hma1Δ/ΔB</i>	<i>orf19.2115Δ::FRT/ orf19.2115Δ::orf19.2115-T_{ACT1}-SAT1-FLIP</i>	This study
<i>hma1Δ/HMA1</i>	<i>HMA1KS1</i>	<i>orf19.2115Δ::FRT/ orf19.2115Δ::19.2115-T_{ACT1}-FRT</i>	This study
Wü284	<i>C. dubliniensis</i> wild-type strain		(84)
CdCSP1-GFP	Wü284	<i>CD36_30750/ CD36_30750-GFP-T_{ACT1}</i>	(33)
CdUM4A	Wü284	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT</i>	(77)
CdINT1	CdUM4A	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3::FRT::pCdINT1</i>	(25)
CdINT2	CdUM4A	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3::FRT::pCdINT1-Ca21chr2:22964-27892W</i>	This study
Cd2113	CdUM4A	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2113</i>	This study
Cd2114	CdUM4A	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2114</i>	This study
Cd2115	CdUM4A	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2115</i>	This study
<i>CdHMA1/SAT1</i> A/B	Wü284	<i>CD36_15150Δ::SAT1-FLIP/ CD36_15150</i>	This study
<i>CdHMA1/Cdhma1Δ</i> A/B	<i>CdHMA1/SAT1</i> A/B /B	<i>CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150</i>	This study
<i>Cdhma1Δ/SAT1</i> A/B	<i>CdHMA1/Cdhma1Δ</i> A/B	<i>CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150Δ::SAT1-FLIP</i>	This study
<i>Cdhma1Δ/Δ</i> A/B	<i>Cdhma1Δ/SAT1</i> A/B	<i>CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150Δ::FRT</i>	This study
<i>CdHMA1KS1A</i> /B	<i>Cdhma1Δ/ΔA/B</i>	<i>CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150Δ::CD36_15150-T_{ACT1}-SAT1-FLIP</i>	This study

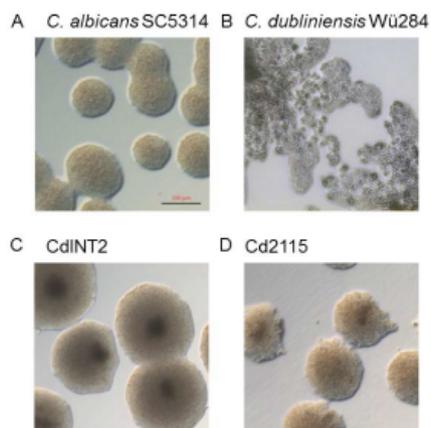
18

<i>Cdhma1Δ/HMA1A/B</i>	CdHMA1KS1A/B	<i>CD36_15150Δ::FRT/CD36_15150Δ::CD36_15150-T_{ACT1}-FRT</i>	This study
Cd2115_CdHMA1/ <i>SAT1A/B</i>	Cd2115	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2115 CD36_15150Δ::SAT1-FLIP/ CD36_15150</i>	This study
Cd2115_CdHMA1/ <i>Cdhma1Δ A/B</i>	CdHMA1M1A/B	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2115 CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150</i>	This study
Cd2115_Cdhma1Δ/ <i>SAT1A/B</i>	CdHMA1M2A/B	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2115 CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150Δ::SAT1-FLIP</i>	This study
Cd2115_Cdhma1Δ/ <i>Δ A/B</i>	CdHMA1M3A/B	<i>Cdura3Δ::FRT/ Cdura3Δ::FRT::pCdINT1-CaORF19.2115 CD36_15150Δ::FRT/ CD36_15150Δ::FRT</i>	This study

812

813

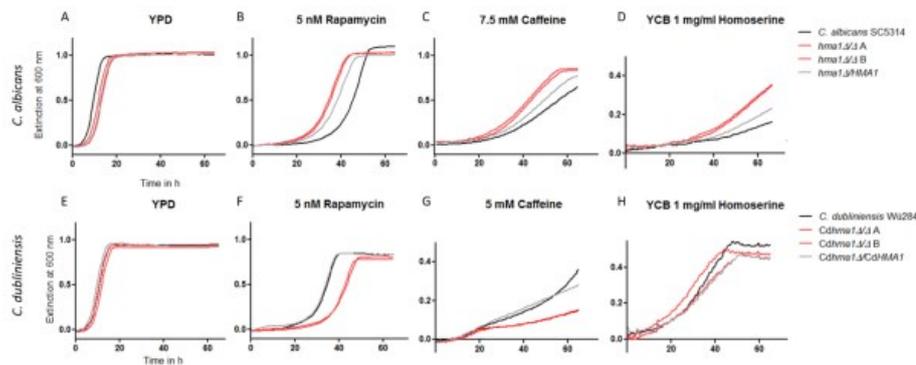
814 **Figures**



815

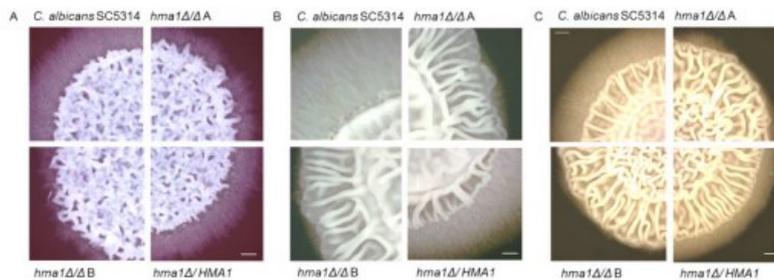
816 **Figure 1** Screening of a *C. albicans* genomic library on SLAD-agar.
 817 Cells were cultivated in liquid SD-medium overnight (30 °C, 180 rpm) and spread onto SLAD medium.
 818 Agar plates were incubated for two days at 30°C in the dark. (A) The *C. albicans* wild type strain
 819 SC5314 grew in yeast-containing smooth colonies, whereas (B) *C. dubliniensis* Wü284 formed
 820 pseudohyphae with endterminal chlamyospore, identifiable in rough colony morphology. (C) By
 821 screening the integrative genomic *C. albicans* library in *C. dubliniensis* CdINT2 was isolated as the
 822 transformant resembled the smooth colony morphology of *C. albicans*. (D) Integration of *C. albicans*
 823 orf19.2115 (HMA1) in *C. dubliniensis* resulted in the strain Cd2115 that phenocopied *C. albicans*-
 824 specific colony morphology.
 825 The scale bar represents 100 µm.

826



827

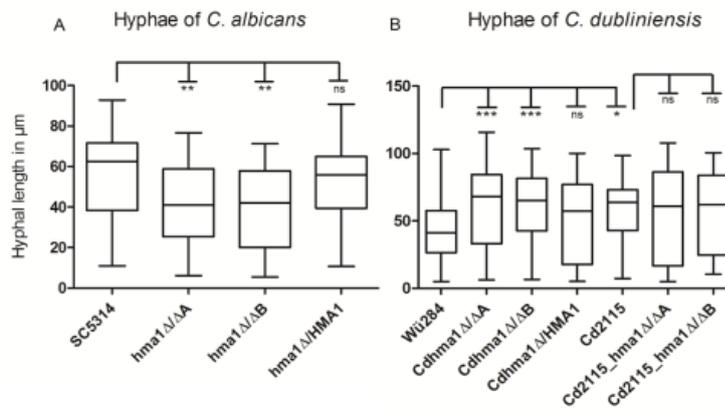
828 **Figure 2** Stress resistances of *C. albicans* *hma1Δ/Δ* and *C. dubliniensis* *Cdhma1Δ/Δ* strains
 829 *Candida* strains (*C. albicans*: SC5314, *hma1Δ/Δ*, *hma1Δ/HMA1* and *C. dubliniensis*: Wü284,
 830 *Cdhma1Δ/Δ*, *Cdhma1Δ/HMA1*) were grown overnight in YPD medium at 30°C. For preparation of
 831 growth curve assay cells were washed and set to an optical density of 0.01 in 200 μl medium in 96-
 832 well plates. Growth of *C. albicans* strains was monitored over 65 h in (A) YPD, (B) YPD plus 5 nM
 833 Rapamycin, (C) YPD plus 7.5 mM Caffeine and (D) YCB plus 1mg/ml L-homoserine. *C. dubliniensis*
 834 strains were grown in (E) YPD, (F) YPD plus 5 nM Rapamycin, (G) YPD plus 5 mM Caffeine and (H)
 835 YCB plus 1mg/ml L-homoserine.



836

837 **Figure 3** Filamentation of *C. albicans* strains on solid agar.
 838 *C. albicans* cells from a YPD overnight culture were washed and 10^5 cells each strain were spotted on
 839 (A) chocolate agar, (B) Spider agar, and (C) YPD agar. Plates were incubated at 37 °C for five days.
 840 Each medium induced wrinkling in the center of the colonies and hyphae formation by the *C. albicans*
 841 wild type SC5314. The *hma1Δ/Δ* mutant strains were severely impaired in formation of the hyphal
 842 fringe, but central warps remained. The scale bar represents 0.5 cm.

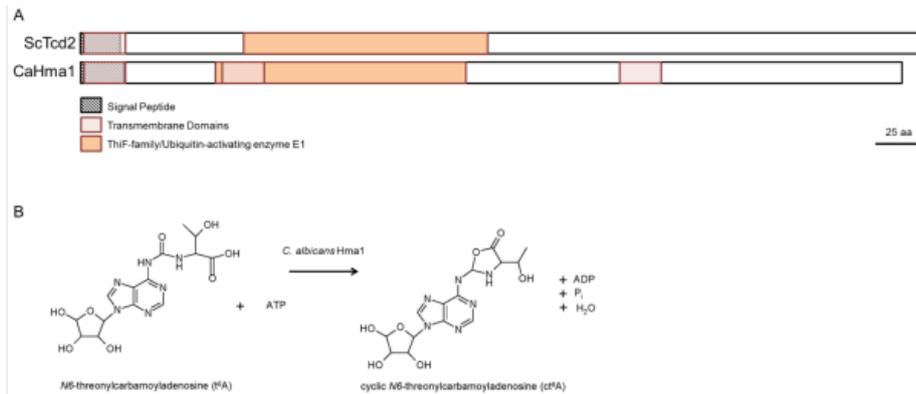
843



844

845 **Figure 4** Length of hyphae of *C. albicans* and *C. dubliniensis* strains incubated in water plus 10%
846 serum.

847 *Candida* cells from a YPD overnight culture were washed and 10^4 cells each strain were inoculated
848 into 500 μ l water plus 10% FCS. After incubation for 4 h at 37 °C and 5 % atmospheric CO₂ content
849 cells were washed, fixed and hyphal length was measured microscopically. (A) *C. albicans* *hma1Δ/Δ*
850 mutants had significantly shorter hyphae than the wild type strain. (B) *C. dubliniensis* *Cdhma1Δ/Δ*
851 mutants had longer filaments compared to the wild type Wü284 and filaments of Cd2115 were also
852 elongated compared to Wü284, but *Cdhma1Δ/Δ* gene deletion in the Cd2115 background did not
853 alter hyphae length. Statistical analysis used one-way ANOVA test ($P = 0.0001$ for experiment A and
854 $P = 0.0002$ for experiment B)



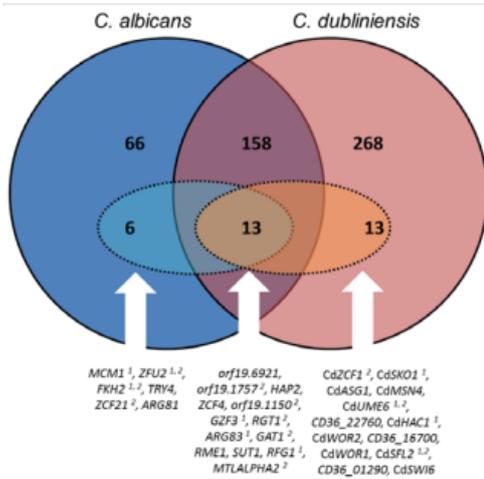
855

856

857 **Figure 5** Structure and function of tRNA threonylcarbamoyladenine dehydratases in yeasts.
858 Conserved protein structures and enzymatic functions of Hma1 in *C. albicans* and Tcd2 in
859 *S. cerevisiae* were proposed. (A) ScTcd2 (447 aa) and CaHma1 (434 aa) proteins share an N-terminal
860 signal peptide, transmembrane domains and a ThiF-like E1 ubiquitin-activating enzyme domain.
861 Protein information was obtained from <http://www.candidagenome.org> and
862 <http://www.yeastgenome.org>, respectively. Scale bar: 25 aa. (B) Proposed model of cyclic N6-
863 threonylcarbamoyladenine formation with an oxazolone ester ring at position 37 of tRNAs by
864 Hma1 reaction in *C. albicans* (Designed with ISISM/Draw2.1.4.).

21

865



866

867

868

869

870

871

872

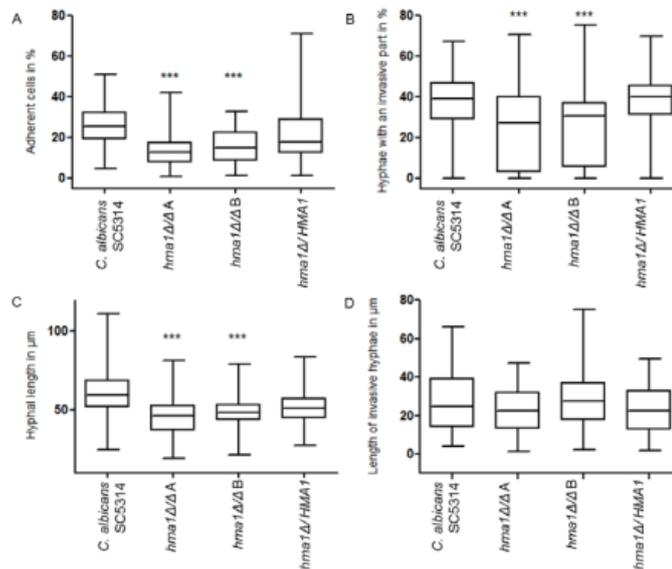
873

874

Figure 6 Venn diagram listing the numbers of genes with accumulation of ANN codon-stretches (normalized cluster score ≥ 1.0) in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. GO term analysis revealed enrichment for genes with transcription factor binding activity (dashed lines) in both species ($p = 0.01765$ for *C. albicans* and $p = 0.00025$ for *C. dubliniensis*). All genes have orthologs in *C. albicans* and *C. dubliniensis* and therefore, the *C. albicans* corresponding gene name was displayed. *C. albicans* genes were labeled for correlation to morphology or virulence.

¹ Gene associated with morphology in *C. albicans*

² Gene associated with virulence in *C. albicans*



875

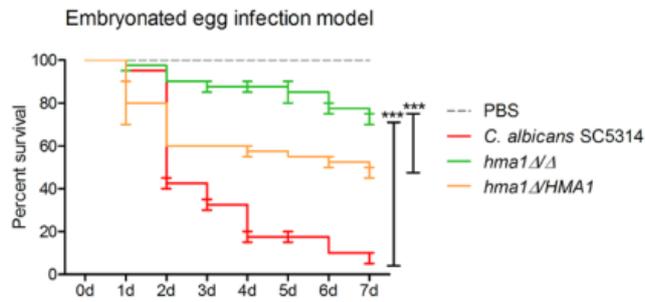
876

877

878

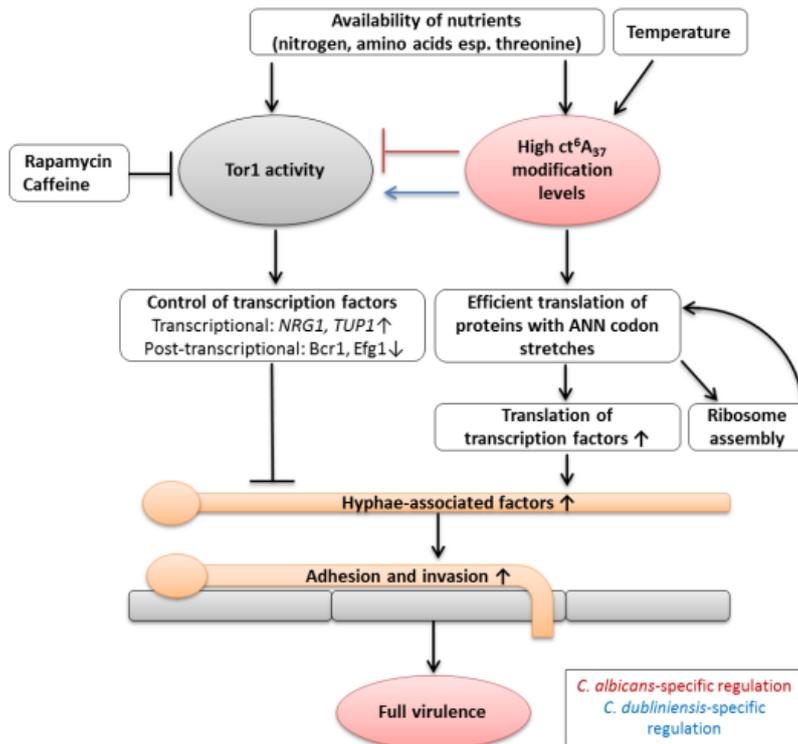
Figure 7 *C. albicans hma1Δ/Δ* mutants have defects to adhere and to invade oral epithelial cells.

879 *C. albicans* cells were washed and a MOI of 0.4 was used to infect two days old TR146 cells. After co-
 880 incubation of fungal and human cells for three hours non-adherent cells were rinsed and samples
 881 were fixed for staining and microscopical analysis. *C. albicans hma1Δ/Δ* mutants were (A) less
 882 adherent and (B) less invasive. (C) The total hyphae length was reduced for *hma1Δ/Δ* strain, but (D)
 883 unaltered for the invasive hyphae parts. Statistical analysis used one-way ANOVA test ($P < 0.0001$ for
 884 experiment A, B, C and $P = 0,0159$ for experiment D)



885

886 **Figure 8** Virulence of the *C. albicans* wild-type strain SC5314, the *hma1Δ/ΔB* mutant, and the
 887 *hma1Δ/HMA1* revertant in infected chicken embryos.
 888 Survival after infection is depicted as Kaplan-Meier plots. There were 20 chicken embryos per group
 889 per experiment, and the combined results of two independent experiments are shown. The mutant
 890 *hma1Δ/ΔB* exhibited significantly attenuated virulence ($P < 0.001$) compared with the wild type
 891 and the reconstituted mutant *hma1Δ/HMA1*, as calculated by the log-rank (Mantel-Cox) test.
 892



893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910

Figure 9 Model presenting the impact of ct^6A_{37} tRNA modification levels to pathogenicity-related features in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Environmental signals like high levels of nutrients sources or elevated temperatures positively induce Hma1 and Tor1 activity. The latter is described to determine filamentation intensity of *C. albicans* and *C. dubliniensis* via transcriptional and posttranslational regulation (32), but addition of rapamycin or caffeine inhibits this pathway. Hma1 interferes with the TOR pathway in a species-specific manner. In parallel, the ANN-codon specific ct^6A tRNA modification was predicted to stabilize translation of ribosomal module proteins that feeds the feedback loop of precise translation processes. Further targets of ct^6A modification include transcription factors which contribute to gene expression of morphology and virulence-associated factors. The interplay of both pathways positively control filamentation of *C. albicans* in ct^6A -replete cells and it accompanies with proper adhesion and invasion of surfaces like epithelia. The importance of these pathogenicity elements to shape fungal virulence was particularly reflected in an egg infection model whereas mortality of chicken embryos strongly correlated with Hma1-driven tRNA modification in *C. albicans*.

911 **Supplementary**

912

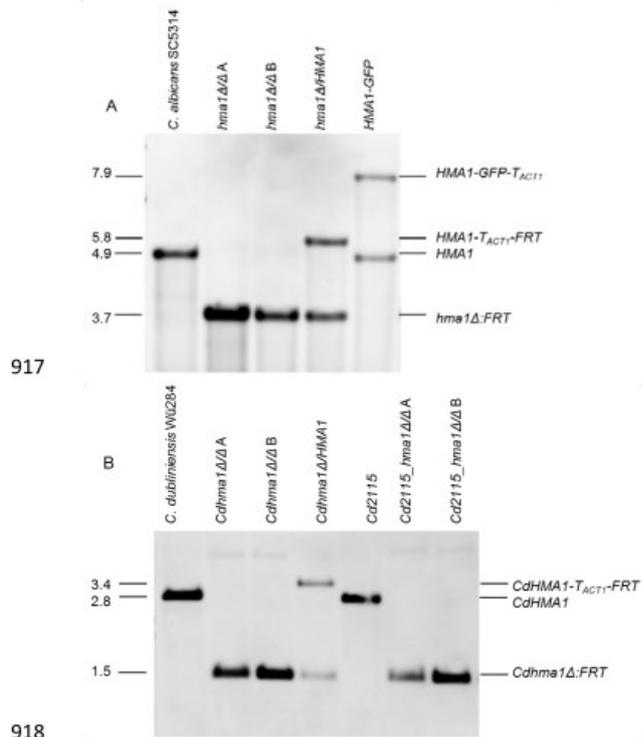
913 **Table S1** Primers in this study

Primer	Sequence (5'→3')
IF2115_1:	TACCGTCGACCTCGAGTGTATAGATAGATGTACCGAAT
IF2115_2:	AAAAGCTGGGTACCGGGCCCGTTGATGAAAAAGAAACAGAG
IF2114_1:	TACCGTCGACCTCGAGATAGTGTAAATATATGTTGCGG
IF2114_2:	AAAAGCTGGGTACCGGGCCCTAAGGATGATGGACCCAAA
IF2113_1:	TACCGTCGACCTCGAGACAAGAAAAAGTCACACGCAGG
IF2113_2:	AAAAGCTGGGTACCGGGCCCGTTGTTGATTGAGAGAAACTAGA
CdUra14	CTCCATTCCAGTAACACCA
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGACC
2115_3	GAACAgGgcCcTTCATTCAAGCACGAAGGGC
2115_4	TATAGcTCgaGGTGACATCTAAGGATGATGGAC
2115_5	GAAAAAcCgchgTTTTATTGCTCGCAACTCCC
2115_6	GAAAGgAGctCCCATGTTGCATGCTCGTTC
2115_7	GCTTTTTCTATAggatccTTATCTAAACTGAG
2115_8	CAATTTTTATgcGgcCGCAACTC
2115_9	GTTGCATcCgCGgTCITTTGTCTAC
2115_8G	CTATACAcggaTccTCTAAACTGAG
2115_9G	TTATTTGcctGCAgCTCCCAA
15150_3	TCATTcggGccCGAAGGGCCAGAAACCAGACG
15150_4	CAGATctcgagACAGATCTTGGTGACATTTGAAGA
15150_5	GTTTcccgggAGGGTTTTGGCGTTGCATTC
15150_6	CATTTgagcTcACCTGCCTTGACTCCAAACT
15150_6c	CATTTgagcTcAgCTGCCTTGACTCCAAACT
15150_7	TGTCTcccgggTTATCTAAACTG

914

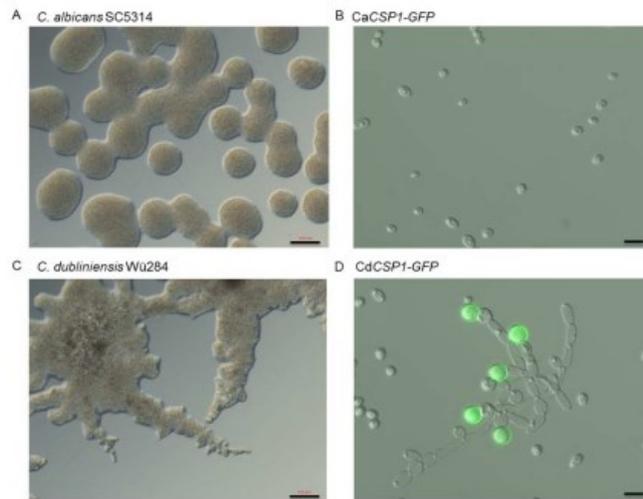
915 Lowercase letters are nucleotide exchanges to create the bold restriction sites. Underlined letters

916 show a second restriction site.



919 **Figure S1.** Confirmation of strains

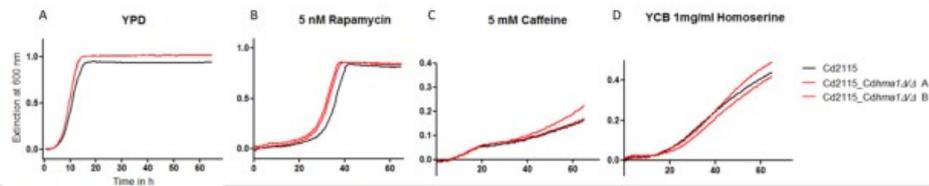
920 A) Confirmation of *C. albicans* strains. Southern-Hybridisation: *EcoRI* cut gDNA of the wild type
 921 SC5314 (lane 1), the homozygous mutants *hma1Δ/Δ* A/B (lane 2/3), the complemented strain
 922 *hma1Δ/HMA1* (lane 4) and the *HMA1-GFP*-fusion strain (lane 5) with the *HMA1*-downstream specific
 923 probe. The band identities are named at the right border and the gDNA fragment sizes (in kb) are
 924 indicated at the left. B) Confirmation of *C. dubliniensis* strains. Southern-Hybridisation: *SphI* cut gDNA
 925 of the wild type Wü284 (lane 1), the homozygous mutants *Cdhma1Δ/Δ* A/B (lane 2/3), the
 926 complemented strain *Cdhma1Δ/HMA1* (lane 4), the *Cd2115* strain (lane 5) and homozygous mutants
 927 *Cd2115_hma1Δ/Δ* A/B (lane 6/7), with the *CdHMA1*-upstream specific probe. The band identities are
 928 named at the right border and the gDNA fragment sizes (in kb) are indicated at the left.



929

930 **Figure S2.** Colony and single cell morphology of *C. albicans* and *C. dubliniensis* on SLAD-agar

931 *C. albicans* wt SC5314 (A), *C. dubliniensis* wt Wü284 (C) and the chlamydoconidium-specific reporter
 932 strains *CaCSP1-GFP* (B) and *CdCSP1-GFP* (D) were grown in liquid SD-medium overnight and spread
 933 onto SLAD-agar. Agar plates were incubated three days at 30 °C in the darkness. Pseudohyphae and
 934 chlamydoconidium formation was exclusively observed by *C. dubliniensis* strains. *CdCSP1-GFP* produced
 935 frequently end-terminal fluorescent chlamydoconidia, whereas *C. albicans* remained in yeast-form.
 936 Thus, no fluorescence signal was detectable using *CaCSP1-GFP* strain. The scale bar represents
 937 100 µm in pictures A and C and 10 µm in pictures B and D.

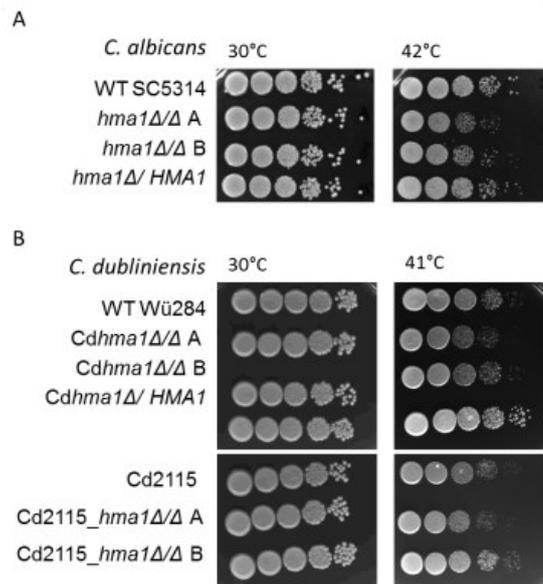


938

939 **Figure S3** Stress resistances of *C. dubliniensis* Cd2115 and Cd2115_ *hma1Δ/Δ* strains

940 Growth of *C. dubliniensis* strains was monitored over 65 h in (A) YPD, (B) YPD plus 5 nM Rapamycin,
 941 (C) YPD plus 5 mM Caffeine and (D) YCB plus 1mg/ml L-homoserine.

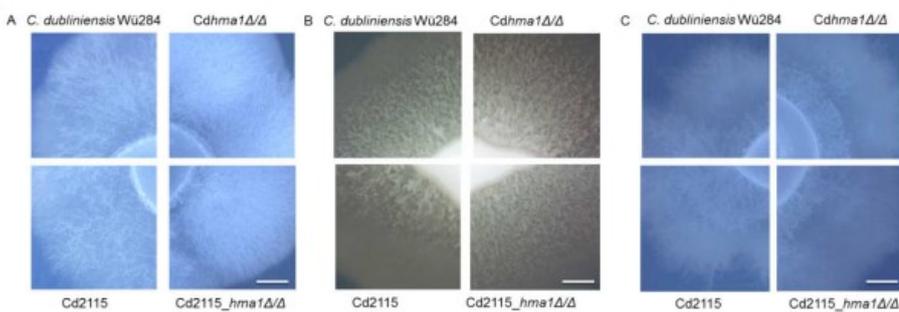
942



943

944 **Figure S4** Serial drop dilution test at elevated temperatures

945 10^7 to 10^2 *Candida* cells were dropped onto YPD-agar plates and incubated for 2 days at standard and
 946 elevated temperatures. Heat stress resistance was assayed for *C. albicans* strains (A) at 42°C and for
 947 *C. dubliniensis* strains (B) at 41°C.



948

949 **Figure S5** Filamentation of *C. dubliniensis* strains on solid agar.

950 *C. dubliniensis* cells from a YPD overnight culture were washed and 10^5 cells each strain were spotted
 951 on (A) SLAD agar, (B) Spider agar, and (C) water agar. Plates were incubated at 37 °C for 14 days. The
 952 scale bar represents 1 cm.

953

5 Material und Methoden

5.1 Mikroorganismen und Medien

5.1.1 Verwendete *Candida*-Stämme und deren Anzucht

C. albicans und *C. dubliniensis*-Stämme, die zusätzlich zu den publizierten Stämmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Für eine mittelfristige Lagerung wurden die Hefestämme regelmäßig auf YPD-Vollmedium ausgestrichen und eine dauerhafte Lagerung erfolgte in Form von Glycerin-Kryokulturen, die bei -80 °C aufbewahrt wurden.

Tabelle 3 Verwendete *Candida*-Stämme

Stammbezeichnung	Parental-stamm	Genotyp	Referenz
<i>C. albicans</i> Stämme			
SC5314	Wildtypstamm		[176]
CAI4	SC5314	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	[177]
SN87	CAI4	<i>leu2Δ/leu2Δ his1Δ/his1Δ</i> <i>URA3/ura3::imm434 IRO1/iro1::imm434</i>	[178]
SN87HL	SN87	<i>rps1::(CdHIS1 CmLEU2</i> <i>URA3/ura3::imm434 IRO1/iro1::imm434</i>	Arnold Bito, Salzburg
CaINT1	CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>CDR4::pRPT4-URA3</i>	Diese Arbeit
CaINT2	CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>CDR4::pRPT4-URA3-</i> <i>Chr1_C_dubliniensis_CD36:2413733-</i> <i>2418892</i>	Diese Arbeit
Ca10050INT	CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>CDR4::pRPT4-URA3-</i> <i>Chr1_C_dubliniensis_CD36: 2413968-</i> <i>2419733</i>	Diese Arbeit
CaMNN2INT	CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>CDR4::pRPT4-URA3-</i> <i>Ca22chr1A_C_albicans_SC5314: 2377637-</i> <i>2381412</i>	Diese Arbeit
ZCF28M1	SC5314	<i>zcf28Δ::SAT1-FLIP/ZCF28</i>	Diese Arbeit
ZCF28M2	ZCF28M1	<i>zcf28Δ::FRT/ZCF28</i>	Diese Arbeit
ZCF28M3	ZCF28M2	<i>zcf28Δ::FRT/zcf28Δ::SAT1-FLIP</i>	Diese Arbeit
<i>zcf28Δ/Δ</i>	ZCF28M3	<i>zcf28Δ::FRT/zcf28Δ::FRT</i>	Diese Arbeit
orf19.4768M1	SC5314	<i>orf19.4768Δ::SAT1-FLIP/orf19.4768</i>	Diese Arbeit
orf19.4768M2	orf19.4768M1	<i>orf19.4768Δ::FRT/orf19.4768</i>	Diese Arbeit

Stammbezeichnung	Parental-stamm	Genotyp	Referenz
<i>orf19.4768Δ/Δ</i>	orf19.4768M3	<i>orf19.4768Δ::FRT/orf19.4768Δ::FRT</i>	Diese Arbeit
<i>ncs2Δ/Δ</i>	SN87	<i>ncs2Δ::CdHIS1/ncs2Δ::CmLEU2</i> <i>IRO1/iro1Δ::λimm434</i>	Labor Leidel, MPI Münster
<i>C. dubliniensis</i> Stämme			
Wü284	Wildtypstamm		[179]
CdUM4	Wü284	<i>CdURA33Δ::FRT/CdURA3Δ::FRT</i>	[180]
CdZCF28 ^{OE}	Wü284	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-caZCF28-caSAT1</i>	Diese Arbeit, Labor Staib

5.1.2 Verwendete Medien

Die Herstellung der *Candida*-Transformanten basierte auf zwei verschiedenen Selektionssystemen. Bei der Arbeit mit den Expressionsmutanten, die auf den gDNA-Bibliotheken basierten, wurde anhand der erworbenen Uridinprototrophie gegenüber den Uridin-negativen Ausgangsstämmen CAI4 und CdUM4 selektiert. Dazu wurden die Transformanten auf Uridin-freiem SD-Agar (Yeast Nitrogen Base Medium mit Ammoniumsulfat und CSM-Zusatz ohne Uridin, beides von MP, Santa Ana, CA, USA) kultiviert. Die Deletionsmutanten wurden mit der SAT1-Flipper-Methode konstruiert [181], welche einen recyclebaren Nourseothricin-Resistenzmarker nutzt und zur Selektion wurde den YPD-Platten 100 mg/L Nourseothricin (WERNER BioAgents, Jena, Deutschland) zugesetzt.

YPD war das Basismedium für Resistenzanalysen unter Zugabe verschiedener Stressoren. Wurde die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen untersucht, wurden diese dem synthetischen YNB-Medium mit Ammoniumsulfat zugegeben. Tabelle 6 zeigt die verwendeten Stressoren zur Charakterisierung der Deletionsmutanten.

Für die morphologischen Untersuchungen zur Chlamydosporen- und Filamentbildung wurden die *Candida*-Stämme auf SLAD (synthetic low-ammonium dextrose)-Agar, bestehend aus 1,7 g/L YNB-Medium ohne zusätzlicher Stickstoffquelle (Yeast Nitrogen Base Medium ohne Ammoniumsulfat, MP, Santa Ana, CA, USA) mit Zusatz von 2% Glucose und 2% Agar (Agar-Agar, Kobe I, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), ausgestrichen. Um lösliche Stickstoffquellen des Agars zu reduzieren, wurde dieser mehrfach mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen. Des Weiteren wurde Maismehlagar (CM, corn meal, BD, Heidelberg, Deutschland) als Standardmedium der Chlamydosporeninduktion genutzt. Filamente wurden zudem auf Kochblutagarplatten (Chocolate agar, BD, Heidelberg, Deutschland), Spider-Agar (1% Mannitol; 1% Nährbouillon; 0,2% K₂HPO₄, pH 7,2, alle Chemikalien von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und FBS-haltigen Medien (FBS von Bio&SELL GmbH, Feucht, Deutschland) induziert.

5.1.3 Wachstumsanalysen

5.1.3.1 Tropftestanalysen

YPD-Übernachtskulturen wurden zweimal mit dH₂O gewaschen und ausgehend von einer Zellzahl von 10⁸ Zellen/ml wurde eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt von welcher jeweils 5 µl der Kultur auf

die Agaroberflächen getropft wurden. Nach einer Inkubationsdauer von zwei bis drei Tagen wurde das Wachstum photographisch (Chemoimager, Vilber-Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland) dokumentiert.

5.1.3.2 Wachstumskurven

Die *Candida*-Zellen wurden über Nacht in YPD bei 30 °C unter stetigem Schütteln bei 180 rpm inkubiert, geerntet, zweimal mit dH₂O gewaschen und auf eine Start OD_{600 nm} von 0,01 im Testmedium eingestellt. Die Extinktion bei OD_{600 nm} als Maß der Zelldichte wurde über 45 h während einer Inkubation bei 30 °C alle 30 min erfasst. Für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen wurde die Testplatte vor jeder Messung für 10 s geschüttelt.

Zur Charakterisierung der *C. albicans*-Gene *ZCF28* und *orf19.4768* wurde das Wachstum entsprechender Deletions- Expressions- und Wildtypstämme in Gegenwart vielfältiger zellulärer Stressoren analysiert. Eine Übersicht der getesteten Wachstums- und Stresskonditionen wurde in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4 Übersicht der Wachstumsmedien, Konditionen und Stressoren zur Charakterisierung von *Candida*-Transformanten

Testmedium	Festmedium	Flüssigmedium
Basismedium (Inkubation bei 30 °C)	YPD SD	YPD SD
Temperaturstress (Inkubation bei 37 °C, 41 °C und 42 °C)	YPD	
Stressmedium auf YPD- Basis (Inkubation bei 30 °C)	25 µM Calcofluor-White 0,75 mM EDTA 5 mM H ₂ O ₂ 0,4 M LiCl 80 µM Menadion 1,1 M NaCl 0,04% SDS	1 mM 3-Amino-1,2,4-triazol 10 µM und 100 µM Caspofungin 0,3 M LiCl 70 µM Menadion 1 M NaCl SD + 0,005% SDS 1 mM und 5 mM CuSO ₄ 4 mM DTT 8 µg/ml Fluconazol 5 mM und 7,5 mM Koffein 5 µM und 7,5 µM Rapamycin 1 M Sorbitol 1 µg/ml und 10 µg/ml Tunicamycin

Testmedium	Festmedium	Flüssigmedium
Verwertung einzelner Nährstoffe (Inkubation bei 30 °C)	YP YP + 2% Glycerin YP + 2% Laktose YP + 2% Xylose	YNB + 2% Glycerin YNB + 2% Xylose LZM0 LZM5 SLAD + 50 µM Ammoniumsulfat YNB + 2% <i>N</i> -Acetylglucosamin YNB + 2% Ethanol YNB + 2% Mannitol YNB + 2% Galaktose
Morphologisches Medium	Kochblutagar (37 °C) Maismehlagar und Reisagar (27 °C) SLAD (27 °C) Spider-Agar (37 °C) Staibagar (27 °C) Wassergar + 10% FBS (37 °C) YPD (37 °C) unter Normoxie und 5% CO ₂	YPD + 10% FBS (37 °C)

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolation genomischer DNA aus *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus *Candida*-Zellen wurde eine 10 ml YPD-Übernachtskultur abzentrifugiert, gewaschen und lytisch verdaut (Lyticase-Puffer: 1 M Sorbitol; 100 mM Natriumacetat pH 5,8; 50 mM EDTA pH 8,0; 2% β -Mercaptoethanol; 500 U/ml Lyticase (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)). Daraufhin wurden Proteine abgebaut (Proteinase-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 7,5; 0,5% SDS; 1 mg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich)) und die freigesetzte gDNA wurde durch die Zugabe eines Gemisches aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, mit Isopropanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Die chromosomale DNA wurde in 80 µl bidest. H₂O + 2 µl RNaseA (50 mg/ml, Sigma-Aldrich) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungen

Für die Amplifikation der heterolog integrierten DNA-Fragmente aus den Transformanten der Genbibliotheken wurde die LongAmp-Taq Polymerase (NEB, New England Biolabs GmbH, Frankfurt-Höchst, Deutschland), unter Beachtung der Herstellerangaben, verwendet. PCR-Produkte, die für Klonierungen, Transformationen oder Sequenzierungen genutzt worden, wurden mit der proof-reading Phusion-Polymerase (NEB) generiert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Für Klonierungen in *E. coli* DH5 α -Rezipienten wurde genetisches Material mit Restriktionsenzymen von NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt-Höchst, Deutschland) geschnitten und für die Ligationsreaktion wurde, soweit nicht anders angegeben, die T4 DNA-Ligase (NEB) verwendet. Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) reisoliert.

Tabelle 5 Sequenzen der Oligonukleotide für die durchgeführten PCR-Reaktionen

Primername	Sequenz (5'-3')	Referenz
Primer für die Konstruktion der Deletionsmutanten		
ZCF28-3	GTAAGACGTTACT GGGCCCCG GAGTAATTAATTA	Diese Arbeit
ZCF28-4	CTTGATTCATTCT CGAGAA ATAGATACAAAATA AATG	Diese Arbeit
ZCF28-5	GTTCAATTTAAACAAGCC CGCGG GAGGCAAGAGG	Diese Arbeit
ZCF28-6	GGTGTATTCTTCTGAAG AGCTC CTTTGCTGTTTT G	Diese Arbeit
4768-1	CAGCAAGAATAGTAG GGCC CATGACGACAAC	Diese Arbeit
4768-2	CAATTATCATTAAATCT CGAGGA ATAATTGATG	Diese Arbeit
4768-3	GATTATGCCATTG CCGCGG CATAGAGAGATTAC	Diese Arbeit
4768-4	GCAAATTA ACTATGGAGCTC GTGCTAGTTATAG	Diese Arbeit
Primer für Arbeiten mit der genomischen Bibliotheken		
FLP12	CAGCAGCACATGATGCTATTTTC	[182]
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Standard- primer
Cd10050_1	GGTCGACGGTAT CGAT GATAAAATGATTATTAA AGACCAA	Diese Arbeit
Cd10050_2	GTGACATTTT GGATCC GGATTGAGATAAGAAGA GGAA	Diese Arbeit
CaMNN2Int1	AGGT CGACGGTATCGAT GAATTGAGATAACAAA AGG	Diese Arbeit
Primername	Sequenz (5'-3')	Referenz
CDR4_Sonde3f	TGCCAAGTGCTATCAGGGAT	Diese Arbeit
CDR4_Sonde3r	TGGGGATCTGATTTGACCGA	Diese Arbeit
CaMNN2_Sonde_Gen_f	TAAGAGCTACAGGCGCCAAA	Diese Arbeit
CaMNN2_Sonde_Gen_r	CCCAAGCGTCTGGCCATAAA	Diese Arbeit
Cd10050_Sonde_Gen_f	AAAGCGCTTCGATATTGGCG	Diese Arbeit
Cd10050_Sonde_Gen_r	CAGGGAGCGTACCCTCAAAA	Diese Arbeit

Eingefügte Restriktionsschnittstellen wurden fett markiert.

5.2.3 Konstruktion von *Candida*-Deletionsmutanten

Die *Candida*-Deletionsstämme dieser Arbeit wurden mit dem SAT1-Flippersystem konstruiert [181]. Kurzgefasst nutzt diese Methode homologe Rekombination am Locus des Zielgens zur Integration

einer Deletionskassette, welche einen Nourseothricinmarker zur Selektion von Transformanten auf Aminoglykosid-Antibiotika-haltigem Medium, trägt. Als Besonderheit ist die gesamte Transformationskassette von FRT-Bereichen (FRT: FLP recombination target) begrenzt. Diese werden von der sequenzspezifischen FLP-Rekombinase, die selbst auf dem Transformationsplasmid kodiert ist, erkannt und das Insertionsfragment kann so exzidiert werden. Dadurch erlaubt die Methode das Wiederverwenden des gleichen Selektionssystems in aufeinander folgenden Transformationszyklen.

5.2.4 Deletion der *C. albicans* Gene *ZCF28* und *orf19.4768*

Vergleichende Genanalysen ergaben, dass die putativen Transkriptionsfaktoren *ZCF28* und *orf19.4768* im *C. albicans*-Genom auftreten, aber in *C. dubliniensis* fehlen. Mit dem Ziel zu untersuchen, ob diese artspezifischen Gene zu der erhöhten Pathogenität von *C. albicans* beitragen, wurden sie mit der SAT1-Flipper-Technik deletiert. Als Basis beider Transformationskassetten diente das Plasmid pSSU1M2 [183], welches die SAT1-Kassette trägt. Für die Integration am *ZCF28*-Genlokus wurde die upstream-Region der Positionen -345 bis +10 ausgehend vom Startcodon mit dem Primern ZCF28-3 und ZCF28-4 und der downstream-Bereich von +679 bis +1032 mit dem Primern ZCF28-5 und ZCF28-6 amplifiziert. Analog wurde das Transformationsfragment für den Gen-Knockout des *orf19.4768* hergestellt: mittels der Primerpaare 4768-1 und 4768-2 sowie 4768-3 und 4768-4 wurden die 5'- und 3' flankierenden DNA-Bereiche der Positionen -346 bis +10 und +1573 bis +1917 amplifiziert. Durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen (in Tabelle 5 und in Abbildung 4 hervorgehoben) konnten beide 5'-Bereiche als *ApaI/XhoI*-Spaltprodukte und die 3'-Fragmente durch Spaltungen mit *SacII/SacI* in den Transformationsvektor integriert werden. Die gewonnenen Plasmide pZCF28M2 und p4768M2 wurden mit *ApaI/SacI* linearisiert und für die Transformation in *C. albicans* SC5314 genutzt. Die einzelnen Schritte der Integration und Exzision der Transformationsfragmente der *C. albicans*-Mutanten M1-M3 und die finalen homozygoten Deletionsmutanten wurden mit der Southern Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 4).

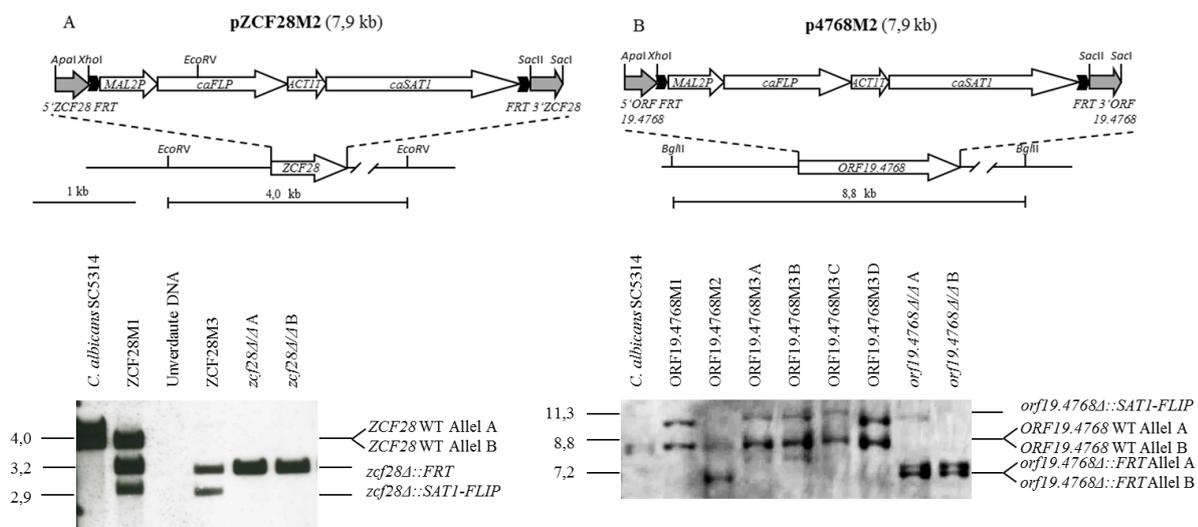


Abbildung 4 Konstruktion der *C. albicans* Deletionsstämme *zcf28Δ/Δ* (A) und *orf19.4768Δ/Δ* (B). Das *ApaI/SacI*-gespaltene Plasmid pZCF28M2 (A) oder p4768M2 (B) wurde in den *C. albicans* SC5314-Stamm transformiert und zum Nachweis der korrekten Integration per Southern Blot-Analyse wurde gDNA mit *EcoRV* (A) oder *BglII* (B) geschnitten und mit einer Sonde, die an den jeweiligen

5'UTR-Bereich bindet, hybridisiert. Die Transformanten wurden wie folgt benannt. M1: Integration der SAT1-Kassette im Wildtypstamm; M2: Heterologe Deletionsmutante; M3: Integration der SAT1-Kassette in der heterologen Deletionsmutante; Δ/Δ : Homozygote Deletionsmutante; A-D: Unabhängige Klone eines Transformationsstadiums.

5.3 *Ex vivo-* und *in vivo*-Infektionsmodelle

5.3.1 Zytotoxizitätstest

Für die zellkulturbasierten Infektionsversuche wurde die humane orale Epithelzelllinie TR146 in DMEM-Medium (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) mit Phenolrot und 10% hitzeinaktiviertem FBS (Bio&SELL GmbH, Feucht-Nürnberg, Deutschland) kultiviert. Eine Koinkubation mit pathogenen *Candida*-Stämmen verursacht Zellmembranschädigungen und damit eine Freisetzung des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH). Dadurch können über die Quantifizierung der LDH-Aktivität im Mediumüberstand Rückschlüsse auf die Integrität der Wirtszellen gezogen werden.

Für den Assay wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen je Well in eine 96-Well-Platte eingesät, und am Tag der Infektion wurde das Standardmedium durch farbloses (indikatorfreies) DMEM-Medium ohne FBS ausgetauscht. Die *Candida*-Zellen wurden in YPD über Nacht bei 30 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Sie wurden mehrfach mit PBS gewaschen und die Zellzahl entsprechend der Ziel-MOI (Multiplizität der Infektion) in DMEM-Medium eingestellt. Für Infektionen mit *C. albicans*-Stämmen wurde eine MOI von 1 und für *C. dubliniensis* eine MOI 10 gewählt. In allen Experimenten erfolgte die Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂. Zur LDH-Quantifizierung wurden Überstände abgenommen. Als interne Kontrollen wurden Mediumkontrollen (Messhintergrund), nicht-infizierte TR146-Zellen (Minimalkontrolle) und chemisch-lysierte Zellen (Maximalkontrolle) mitgeführt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Herstellerangaben (LDH Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Basel, Schweiz). In einer zweistufigen Reaktion wird Laktat durch die freigesetzte LDH zu Pyruvat oxidiert. Dabei erfolgt eine Reduktion von NAD⁺ zu NADH + H⁺, das über eine Diaphorase zur Reduktion eines Tetrazoliumsals zu einem rotfarbenen Formazansalz führt, welches photometrisch quantifiziert werden kann.

5.3.2 Embryoniertes Hühnerei-Infektionsmodell

Das Protokoll zur Infektion von zehn Tage alten Hühnerembryonen mit *Candida*-Zellen wurde von Jacobsen *et al.* etabliert [184]. Zusammengefasst wurden *Candida*-Übernachtulturen zweimal mit PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von 10^8 Zellen/ml als Infektionslösung eingestellt. Für die Inokulation wurde ein kleines Loch in die Eierschale gebohrt, eine künstliche Luftkammer erzeugt und 100 µl der *Candida*-Suspension auf die Chorioallantoismembran appliziert. Die infizierten Eier wurden bei 37,6 °C und 50-60% Luftfeuchte für bis zu sieben Tage inkubiert. Das Überleben der Embryonen wurde täglich durch Durchleuchten überwacht. Die überlebenden Embryonen wurden auf Eis abgekühlt und dadurch spätestens am Entwicklungstag 18 abgetötet. Alle Experimente wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

5.4 Screening einer integrativen Bibliothek von *C. dubliniensis* DNA-Fragmenten in *C. albicans*-Klonen

5.4.1 Herstellung der genomischen Bibliothek

Mit dem Ziel, pathogenitätsrelevante Gene in *Candida*-Arten zu identifizieren, wurde neben der bereits beschriebenen Bibliothek von *C. albicans*-Genomfragmenten in *C. dubliniensis* [62] auch eine reverse Screening-Methode entwickelt (Staub und Morschhäuser, unpublizierte Ergebnisse). Dazu wurde genomische DNA des *C. dubliniensis* Wildtypstamms Wü284 isoliert und mit den Restriktionsenzymen (4-cutter) *Sau3AI* und *MspI* partiell geschnitten. Mittels Gelelektion wurden 4-7 kb große DNA-Fragmente isoliert und über die zu den initialen Schnitten kompatiblen *ClaI*- und *BamHI*-Schnittstellen in den integrativen Vektor pPRT4 (siehe Abbildung 5) integriert, welcher auf dem Vorläuferplasmid pFLPT1234 [182] basiert. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E. coli* transformiert. So wurden etwa 15.000 Klone erhalten, so dass im Mittel das 14,6 Mb große *C. dubliniensis* Genom [135] mehr als fünfmal abgedeckt wurde. Durch Linearisierung der Plasmide mit dem *S. cerevisiae*-spezifischen Restriktionsenym *I-SceI* wurde eine unerwünschte Spaltung innerhalb der *C. dubliniensis* gDNA vermieden. Da sich eine *I-SceI*-Schnittstelle innerhalb des C-Terminus des *CDR4*-Gens von *C. albicans* befindet, diente der *CDR4*-Lokus als Zielsequenz für genomische Integration mittels homologer Rekombination. Die Selektion auf erfolgreiche Insertion erfolgte durch die erworbene Uridinprototrophie durch die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase-Aktivität von *Ura3*. Der Kontrollstamm CaINT1 trägt eine leere pPR4-Kassette ohne *C. dubliniensis*-Fragment.

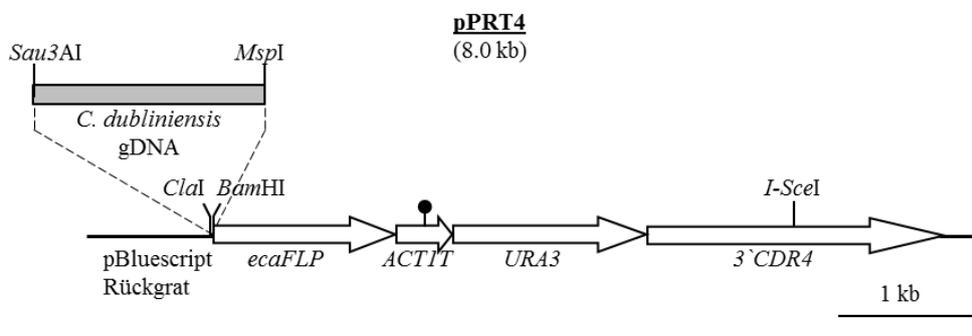


Abbildung 5 Aufbau des integrativen Vektors pPRT4

Das 8 kb große pPRT4 Plasmid wurde enzymatisch mit *ClaI* und *BamHI* gespalten und *Sau3AI/MspI*-geschnittene *C. dubliniensis* gDNA Fragmente wurden integriert. Für die Herstellung der heterologen *C. dubliniensis* Genbibliothek wurde der Plasmid-Pool durch die Spaltung mit *I-SceI* linearisiert und an den *CDR4*-Genlokus in den *C. albicans* CAI4 Stamm eingebracht.

5.4.2 Screening der genomischen Bibliothek und Identifizierung eines morphologieassoziierten Gens

In Analogie zum Screening der Genbibliothek von *C. albicans* DNA-Fragmenten, wurde auch die zweite Genbank, die *C. dubliniensis*-Donor-DNA in *C. albicans* integrierte, unter diskriminierenden Bedingungen getestet. Hierbei wurden ca. 20.000 Transformanten mikroskopisch auf eine abweichende Koloniemorphologie auf SLAD-Agar (30 °C, Dunkelheit) untersucht. Aus

Transformanten, die auch nach mehrfachem Passagieren auf SLAD- und SD-Agar einen stabilen Phänotyp zeigten, wurde das integrierte Fragment per PCR mit den Primern M13 rev und FLP12 (siehe Tabelle 5) amplifiziert. Das gereinigte und konzentrierte DNA-Fragment (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde sequenziert (Seqlab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland). Drei separat isolierte Transformanten enthielten das gleiche DNA-Fragment aus dem *C. dubliniensis*-Chromosom 1 (Position 2413733-2418892). In diesem Bereich findet sich nur der open reading frame (ORF) *CD36_10050* vollständig inklusive des Promotor- und Terminatorbereiches. Dieses Gen ist ein Ortholog des *C. albicans*-Gens *MNN2* (*orf19.2347*). Mit einer dieser Transformanten (als CaINT2 bezeichnet) wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

Um zu verifizieren, dass die phänotypische Änderung auf die Integration von *CD36_10050* zurückzuführen ist, wurde *CD36_10050* und die 5'- und 3'-seitigen UTR (untranslatierte Regionen) per PCR mit den Primern Cd10050_1 und Cd10050_2 amplifiziert (Koordinaten 2413968-2419733 auf Chromosom 1). Die Klonierung in den *Cla*I und *Bam*HI-geschnittenen pPRT4-Vektor wurde mit Hilfe des In-Fusion-Systems (In-Fusion HD Cloning Plus, Takana, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) durchgeführt. Der dadurch generierte Vektor pCa10050Int wurde über die *I-Sce*I-Schnittstelle linearisiert und in das *C. albicans* CAI4-Genom integriert. Um eine phänotypische Änderung nur aufgrund eines Gen-Dosis-Effekts auszuschließen, wurde aus *C. albicans* das *MNN2*-Gen einschließlich der UTR mit dem Primerpaar CaMNN2Int1 und CaMNN2Int2 amplifiziert und ebenso über den pPRKT4-Vektor in den CAI4-Stamm eingebracht.

Die Integration der Gene *CD36_10050* im Stamm Ca10050INT beziehungsweise *CaMNN2* im Stamm CaMNN2INT wurden per Southern Blot-Analyse nachgewiesen. Zum Nachweis des wildtypischen und des integrierten *CD36_10050*-Gens wurde gDNA der parental Stämme *C. albicans* CAI4 und *C. dubliniensis* Wü284 sowie der Transformanten CaINT2, Ca10050INT und CaMNN2INT mit dem Restriktionsenzym *Mfe*I gespalten und Southern Blots nach Standard-Methode durchgeführt (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche, Welwyn Garden City, England). Die Membran wurde mit einer DIG-markierten Cd10050-Gensonde (Primerpaar: Cd10050_Sonde_Gen_f/Cd10050_Sonde_Gen_r) hybridisiert. Die erwarteten Größen der *Mfe*I-Spaltprodukte aus dem *C. dubliniensis*-Wildtyp und für das integrierte Fragment im CaINT2-Stamm waren mit 3,6 kb identisch, während durch eine fehlende *Mfe*I-Schnittstelle in Ca10050INT eine Fragmentgröße von 8,2 kb erwartet und gefunden wurde (Abbildung 4A). Zudem wurde die Integration am *C. albicans* *CDR4*-Lokus durch die Hybridisierung mit einer 3'-UTR gelegenen *CDR4*-Sonde (Primerpaar: CDR4_Sonde3f und CDR4_Sonde3r) nachgewiesen, die mit der *Xba*I-geschnittenen gDNA der *Candida*-Stämme hybridisierte (Abbildung 4B). Die zusätzlichen, schwachen und unspezifischen Banden der Southern Blots sind technischen Ursprungs. Zum Nachweis des *CaMNN2*-Gens wurde eine entsprechende Gensonde (Primerpaar: CaMNN2_Sonde_Gen_f und CaMNN2_Sonde_Gen_r) mit *Hind*III-geschnittener gDNA hybridisiert (Daten nicht dargestellt).

Material und Methoden

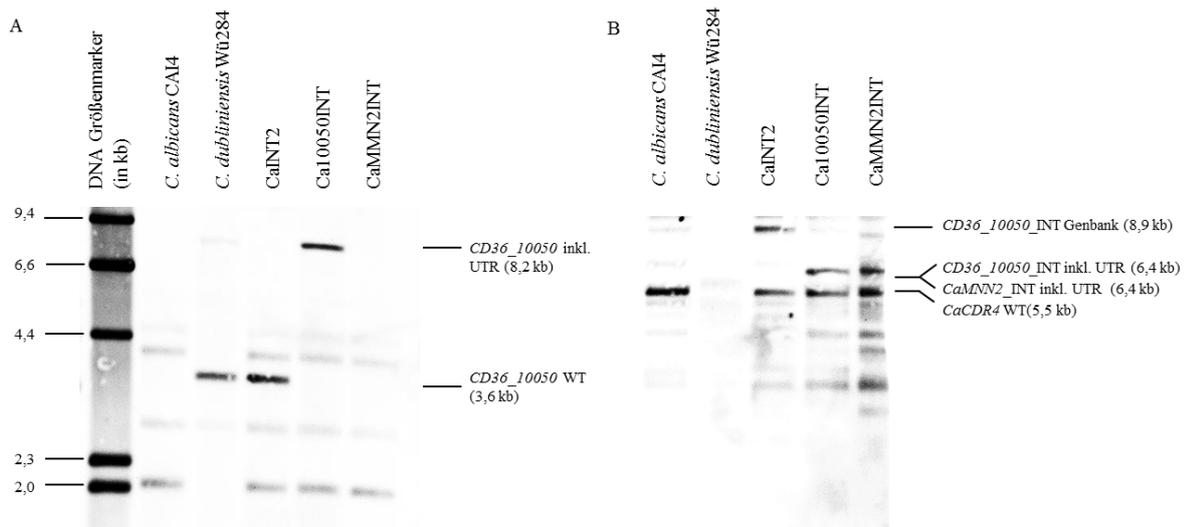


Abbildung 6 Southern-Hybridisierung (A) *Mfe*I- bzw. (B) *Xba*I-gespaltener gDNA der Ausgangsstämme *C. albicans* CAI4 und *C. dubliniensis* Wü284 sowie der Transformanten CaINT2, Ca10050INT und CaMMN2INT mit der *Cd10050*-Gensonde (A) bzw. der 3'UTR *CDR4*-Sonde (B). Der DNA-Größenstandard (in kb) beider Abbildungen ist auf der linken Seite angezeigt und die Identität und Größe der hybridisierten DNA-Fragmente rechts.

6 Ergänzende Ergebnisse

6.1 Charakterisierung der *C. albicans* Gene *ZCF28* und *orf19.4768*

Ein Ziel, das in der vorliegenden Arbeit erreicht wurde, war die Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren in *C. albicans* und *C. dubliniensis* in Hinblick auf ihre speziesspezifischen Funktionen. Im Manuskript 1 wurde mit Csr1 ein konservierter Faktor und seine spezifischen Rollen in der Signaltransduktion beider Arten analysiert. Neben Untersuchungen zu diesem Faktor wurde aber auch Analysen von allein in *C. albicans* vorhandenen Genen, ohne Orthologe in verwandten Arten, durchgeführt. Gerade diese spezifischen Transkriptionsfaktoren könnten potenziell zu der hohen klinischen Relevanz von *C. albicans* im Vergleich zu anderen Arten beitragen.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden durch bioinformatische Analysen artspezifische Gene identifiziert. Dazu wurden von Mitarbeitern der Forschungsgruppe Systembiologie/Bioinformatik (Shelest und Fichtner, HKI Jena) alle orthologen Gene mit einer Sequenzähnlichkeit von mehr als 20% mittels bidirektionale BLAST-Analyse gegenseitig aus den Genomen von *C. dubliniensis* Wü284 und *C. albicans* SC5314 subtrahiert (metaPhors [185]). Die verbliebenen artspezifischen Gene wurden über bekannte Proteinsignaturen des Genprodukts soweit möglich annotiert (InterProScan [186]), und die kodierten Proteine wurden auf funktionelle Domänen untersucht (PFAM [187]). Diese Liste wurde dann auf putative Transkriptionsfaktoren beschränkt [164]. Mit dieser Methode wurden 61 *C. albicans*- und sechs *C. dubliniensis*-spezifische Transkriptionsfaktoren gefunden.

Darunter waren die putativen Zinkfinger-Transkriptionsfaktorgene *ZCF28* und *orf19.4768*, die sich in direkter genetischer Nachbarschaft auf Chromosom 1 in *C. albicans* SC5314 befinden. Während für *Zcf28* bereits eine Rolle in der Adhärenz an Silikonmaterial beschrieben wurde [89], war die Funktion des Produktes von *orf19.4768* unbekannt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die *C. albicans*-Deletionsmutanten *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* hergestellt und ebenso wie die heterologe Überexpressionsmutante *CdZCF28^{OE}* von *C. dubliniensis* in einer Vielzahl von *in vitro*-Bedingungen näher charakterisiert. Tabelle 6 fasst die Testbedingungen zusammen und die Ergebnisse wurden nach Stressantworten, Morphologien und der Biofilmbildung gruppiert.

Tabelle 6 Übersicht der Bedingungen zur Charakterisierung der Mutantenstämme der *C. albicans*-Gene *ZCF28* und *orf19.4768*. Die Medienbedingungen sind der relevanten biologischen Funktion bzw. der zellulären Zielstruktur zugeordnet.

Wachstumsbedingung	Biologische Funktion
Basismedium (YPD oder SD)	Positivkontrollen, um mögliche Wachstumsdefekte zu beurteilen.
Temperaturstress	Essentiell für humanpathogene Mikroorganismen, <i>C. dubliniensis</i> besitzt eine geringe Hitzeresistenz als <i>C. albicans</i> [188].
3-Amino-1,2,4-triazol	Histidinanalogon, das die Gcn4-vermittelte Antwort auf Aminosäuremangel auslöst [189].
Calcofluor-White	Fluoreszenzfarbstoff, der naszierende Chitinpolymere bindet und die Zellwandintegrität stört [190].

Wachstumsbedingung	Biologische Funktion
Caspofungin	Antimykotikum, das durch die Hemmung der $\beta(1,3)$ -D-Glucan-Synthase die Zellwandsynthese beeinträchtigt [191].
EDTA	Als Chelator von di- und trivalent Metalionen induziert EDTA einen Mangel an Spurenmetallen [86].
H ₂ O ₂ und Menadion	Reaktive Sauerstoffspezies lösen oxidativen Stress aus und können DNA, Proteine und Lipide schädigen [192].
LiCl, NaCl und Sorbitol	Erhöhte Salzkonzentrationen lösen osmotischen Stress aus und triggern den HOG- und Calcineurin-Weg [193, 194]
SDS	SDS ist ein Detergens, das die Integrität von Zellmembranen und Zellwänden herabsetzt [195].
CuSO ₄	Kupferüberschuss kann osmotischen Stress verursachen, es verändert die Membranpermeabilität und beeinflusst Eisenhomöostase [196, 197].
DTT	Reduktionsmittel, das die Bildung von Disulfidbrückenbindungen verhindert und die Proteinfaltung beeinflusst [198].
Fluconazol	Antimykotikum, das die 14- α -Demethylase hemmt und die Bildung von Ergosterol blockt [199].
Koffein	Koffein induziert pleiotrope Effekte: Hemmung des TOR-Weges, Verstärkung des cAMP-Weges, mutagene Wirkung, Einfluss auf Zellintegrität [200].
Rapamycin	Inhibitor des TOR-Kinasekomplex, Einfluss auf nährstoffabhängige Signalwege [201].
Tunicamycin	Antimykotikum, welches die N-Glykosylierung inhibiert und damit die Modifikation von Zellwand- und sekretorischen Proteinen verhindert [202].
YP	Peptide als alleinige Kohlenhydratquellen
C-Quelle: Glycerin	Nicht-fermentative Kohlenhydratquelle, Test der Respiration und der Mitochondrienintegrität.
C-Quelle: Laktose	Negativkontrolle, da <i>Candida</i> spp. keine Laktase zur Spaltung des Disaccharids besitzt.
C-Quelle: Xylose	Xylosemetabolismus als Unterscheidungsmerkmal von <i>C. albicans</i> (Xylose positiv) und <i>C. dubliniensis</i> (Xylose negativ) [142, 203].
C-Quelle: N-Acetylglucosamin	Aminozucker als Hypheninduktor von <i>C. albicans</i> [203].
C-Quelle: Ethanol	Ethanol kann respiratorisch katabolisiert werden, hohe Konzentrationen wirken toxisch [204].
C-Quelle: Mannitol	Der Zuckeralkohol kann von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> verstoffwechselt werden [203].

Wachstumsbedingung	Biologische Funktion
C-Quelle: Galaktose	Die Galaktoseassimilation über den Leloir-Weg ist evolutionär konserviert [205].
LZM	Zinkmangelmedium zum Test der Zinkhomöostase.
Kochblutagar (Chocolate-Agar)	Filamentierung bei <i>C. albicans</i> [154].
Maismehl- und Reisagar	Induktion von Chlamydosporen in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> [145].
SLAD-Agar	Stickstofflimitierendes Minimalmedium, welches Chlamydosporen spezifisch bei <i>C. dubliniensis</i> induziert [155].
Spider-Agar	Mannitolhaltiger Spider-Agar induziert Hyphenbildung in <i>C. albicans</i> [35] und <i>C. dubliniensis</i> [156].
Staub (<i>Guizotia abyssinica</i>)-Agar	Chlamydosporenbildung von <i>C. dubliniensis</i> [148].
Serum	In einer nährstoffarmen Umgebung fördert die Zugabe von Serum die Filamentierung von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> [65].
YPD (37 °C) unter 5% CO ₂	Filamentierung bei <i>C. albicans</i> [206].
Biofilmbildung	Beide <i>Candida</i> spp. können Biofilme ausbilden [207].

6.1.1 Resistenz gegen Stressoren

Um die biologische Funktion der *C. albicans* Gene *ZCF28* und *orf19.4768* zu charakterisieren, wurden die *Candida*-Stämme *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis CdZCF28^{OE}* in Anwesenheit unterschiedlicher Stressoren und unter verschiedenen Bedingungen auf Wachstumsdefekte untersucht (Tabelle 7).

Tabelle 7 Stressassoziierte Phänotypen der Stämme *C. albicans zcf28Δ/Δ*, *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis CdZCF28^{OE}*. Die Beurteilung des Wachstums der Transformanten erfolgte relativ zu den parental Wildtypstämmen *C. albicans* SC5314 bzw. *C. dubliniensis* Wü284.

- Moderater Wachstumsnachteil
- Leichter Wachstumsnachteil
- 0 Identisch zum Vergleichsstamm
- + Leichter Wachstumsvorteil
- ++ Moderater Wachstumsvorteil

Testbedingung	<i>zcf28Δ/Δ</i> im Vergleich zu <i>C. albicans</i> SC5314	<i>orf19.4768Δ/Δ</i> im Vergleich zu <i>C. albicans</i> SC5314	<i>CdZCF28^{OE}</i> im Vergleich zu <i>C. dubliniensis</i> Wü284
Temperaturstress auf YPD			
37 °C ¹	0	0	0
41 °C ¹	0	0	+
42 °C ¹	0	0	0

Ergänzende Ergebnisse

Testbedingung	<i>zcf28Δ/Δ</i> im Vergleich zu <i>C. albicans</i> SC5314	<i>orf19.4768Δ/Δ</i> im Vergleich zu <i>C. albicans</i> SC5314	CdZCF28 ^{OE} im Vergleich zu <i>C. dubliniensis</i> Wü284
Stressmedium auf YPD-Basis (Inkubation bei 30 °C)			
YPD ^{1,2}	0	0	0
SD ^{1,2}	0	0	0
1 mM 3-AT ²	0	0	0
25 μM Calcofluor-White ¹	0	0	+
30 μM Calcofluor-White ²	0	0	0
10 μM und 100 μM Caspofungin ²	0	0	0
1 mM und 5 mM CuSO ₄ ²	0	0	0
4 mM DTT ²	0	0	0
0,75 mM EDTA ¹	0	0	0
8 μg/ml Fluconazol ²	++	++	--
5 mM H ₂ O ₂ ¹	0	0	0
5 mM und 7,5 mM Koffein ²	-	-	0
0,3 M LiCl ²	-	-	0
0,4 M LiCl ¹	0	0	0
70 μM Menadion ²	0	0	0
80 μM Menadion ¹	0	0	0
1 M NaCl ²	-	-	0
1,1 M NaCl ¹	0	0	0
5 μM und 7,5 μM Rapamycin ²	-	-	0
SD + 0,005% SDS ²	-	-	0
0,04% SDS ¹	0	0	0
1 M Sorbitol ²	-	+	0
1 μg/ml und 10 μg/ml Tunicamycin ²	0	0	0
Verwertung einzelner Nährstoffe (Inkubation bei 30 °C)			
LZM0 ²	-	-	0
LZM5 ²	-	-	0
SLAD + 50 μM Ammoniumsulfat ²	0	0	0
YNB + 2% <i>N</i> -Acetylglucosamin ²	0	0	0
YNB + 2% Ethanol ²	0	0	0
YNB + 2% Galaktose ²	0	0	0
YNB + 2% Glycerin ²	0	0	0
YNB + 2% Mannitol ²	0	0	0
YP ¹	0	0	0
YP + 2% Glycerin ¹	0	0	0

Testbedingung	<i>zcf28Δ/Δ</i> im Vergleich zu <i>C. albicans</i> SC5314	<i>orf19.4768Δ/Δ</i> im Vergleich zu <i>C. albicans</i> SC5314	<i>CdZCF28^{OE}</i> im Vergleich zu <i>C. dubliniensis</i> Wü284
YP + 2% Laktose ¹	0	0	-
YP + 2% Xylose ¹	0	0	-

Die Wachstumstests wurden auf Festmedium ¹ oder in Flüssigmedium ² durchgeführt.

Unter der großen Mehrheit der vielfältigen Testbedingungen konnten keine nennenswerten Wachstumsunterschiede der Mutanten festgestellt werden. Als Beispiele von Phänotypen unterschiedlicher Stärke wurden hier nur exemplarisch die Ergebnisse der Tropftestanalysen unter Temperaturstress (Abbildung 7) und die Effekte von drei chemischen Stressoren (Lithiumchlorid, Fluconazol, Rapamycin) in Form von Wachstumskurven (Abbildung 8) dargestellt.

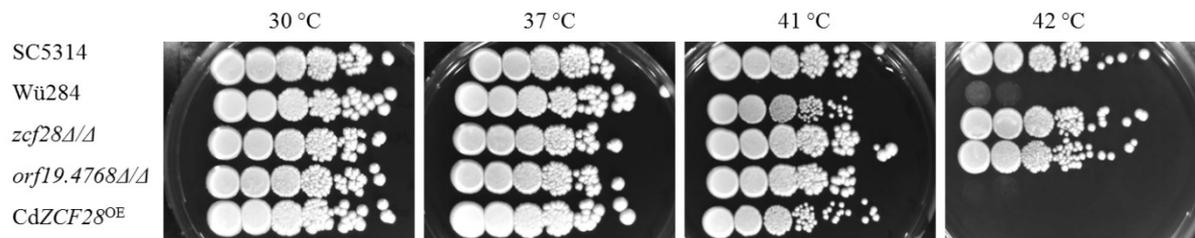


Abbildung 7 Tropftestanalysen der Stämme *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis CdZCF28^{OE}* bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Die Bilder wurden nach einem dreitägigen Wachstum aufgenommen. Bei einer Kultivierungstemperatur von 42 °C ist die charakteristische Hitzesensitivität von *C. dubliniensis* zu beobachten. Mit der Ausnahme eines leicht verbesserten Wachstums des Stammes *CdZCF28^{OE}* entspricht das Wachstum der Transformanten jeweils dem zugehörigen Wildtypstamm.

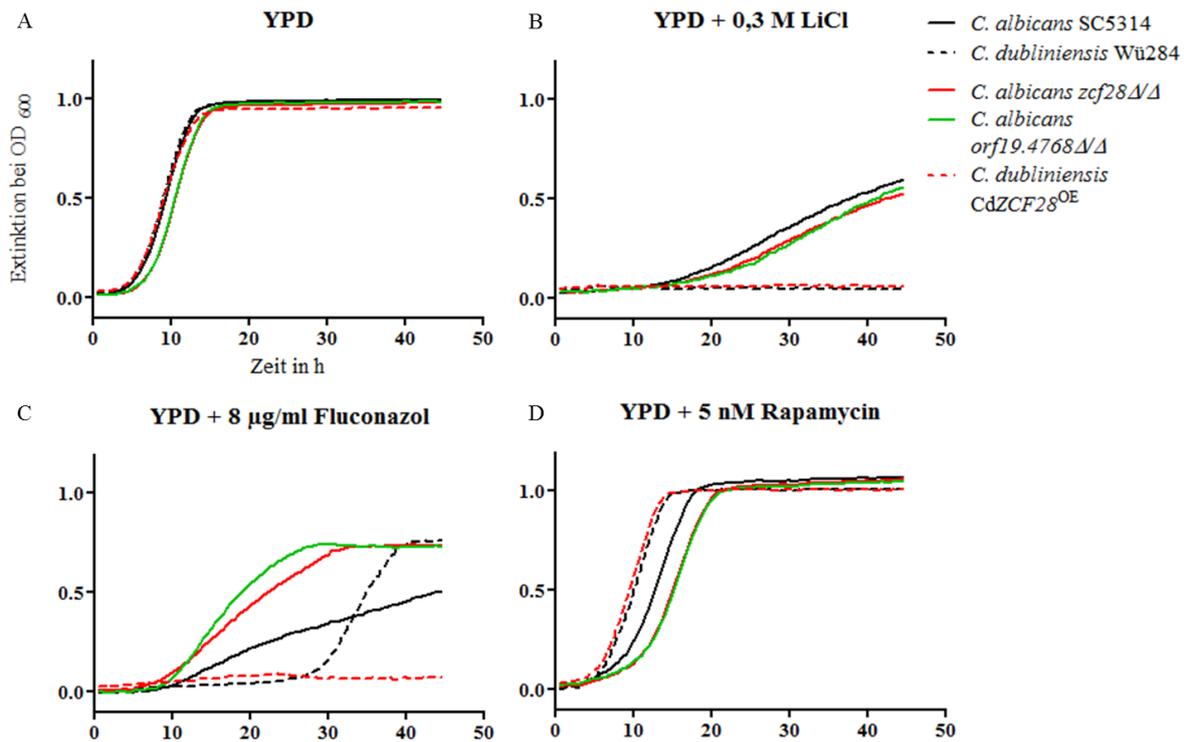


Abbildung 8 Auswahl von Wachstumskurven der Stämme *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis CdZCF28^{OE}*. YPD-Übernachtulturen wurden zweimal mit dH₂O gewaschen und auf eine Start OD_{600nm} von 0,01 im Testmedium eingestellt. Als Wachstumskontrolle wurden die Stämme in (A) YPD-Medium kultiviert und als Stressoren wurden dem Medium (B) 0,3 M LiCl, (C) 8 µg/ml Fluconazol oder (D) 5 nM Rapamycin zugesetzt.

Die Transformanten *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis CdZCF28^{OE}* wurden unter vielseitigen Stressbedingungen (Tabelle 6) charakterisiert, jedoch unterschied sich das Wachstum der Deletions- und Überexpressionsstämmen in der großen Mehrheit der Fälle nicht von ihrem Parentalstamm (Tabelle 7). Interessanterweise zeigen die Knockout-Stämme *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* insgesamt ähnliche Phänotypen. So zeigen beide eine leichte Wachstumsverzögerung in Gegenwart der osmotischen Stressoren NaCl, LiCl (Abbildung 8B) und Sorbitol (hier nur teilweise). Ähnliche Verzögerungen im Wachstum zeigten beide Deletionsstämmen bei Zugabe der TOR-Kinase-Inhibitoren Koffein und Rapamycin (Abbildung 8D), mit dem Zellmembranstressor SDS und unter Zinkmangelbedingungen. Ein leicht erhöhtes Vermögen Xylose als einzige Kohlenhydratquelle zu nutzen war ein spezifischer Phänotyp für die *zcf28Δ/Δ*-Mutante von *C. albicans*. Unter all den bisher genannten Bedingungen zeigte die *C. dubliniensis*-*CdZCF28^{OE}* Transformante, die konstitutiv das *C. albicans*-Gen *ZCF28* exprimiert, keine phänotypischen Unterschiede zum *C. dubliniensis*-Wildtypstamm Wü284. Der Test auf Fluconazolresistenz zeigte die stärkste phänotypische Veränderung bei den Mutantenstämmen: Während die *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ*-Deletionsmutanten eine deutlich höhere Antimykotikumresistenz als ihr Wildtypstamm aufwiesen, führte die heterologe *ZCF28*-Expression in *C. dubliniensis* zu einer stark erhöhten Fluconazolsensitivität (Abbildung 8C). Die komplementären Phänotypen der Deletions- und Expressionsstämmen legen eine enge Verbindung zwischen der *ZCF28*-Genexpression und

Ergosterolbiosynthese, dem Target von Fluconazol, nahe. Des Weiteren traten unter folgenden Bedingungen Phänotypen auf, die spezifisch für den exprimierenden *C. dubliniensis*-Stamm waren: Im Vergleich zum parentalen Stamm hatte die Mutante einen leichten Wachstumsvorteil während der Inkubation bei 41 °C und auf Calcofluor-White-haltigem Festmedium, während ihr Wachstum auf den alternativen Kohlenhydratquellen Xylose und Laktose leicht eingeschränkt war.

6.1.2 Morphologische Tests

Neben der Resistenz gegenüber verschiedensten Chemo- und Thermostressoren ist die Fähigkeit zwischen unterschiedlichen Morphologieformen zu wechseln einer der wichtigsten Virulenzfaktoren der polymorphen Hefen *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Um die Fähigkeit der Stämme *C. albicans* *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis* *CdZCF28^{OE}* zur Filament- und Chlamydosporenbildung zu bewerten, wurden eine Reihe unterschiedlicher Morphologiewechsel-induzierender Medien getestet.

Tabelle 8 Morphologieassoziierte Phänotypen der Stämme: *C. albicans* *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* sowie *C. dubliniensis* *CdZCF28^{OE}*. Die Beurteilung des Wachstums der Transformanten erfolgte relativ zum Wachstum der parentalen Wildtypstämme *C. albicans* SC5314 bzw. *C. dubliniensis* Wü284.

-: Reduzierte Filamentierung oder Chlamydosporenbildung

0: Identisch zum Vergleichsstamm

+: Vermehrte Filamentierung oder Chlamydosporenbildung

Testagar	<i>zcf28Δ/Δ</i> (vs. SC5314)	<i>orf19.4768Δ/Δ</i> (vs. SC5314)	<i>CdZCF28^{OE}</i> (vs. Wü284)
Filamentierung			
Kochblutagar (37 °C)	0	0	0
Spider-Agar (30 °C)	0	0	0
Spider-Agar (37 °C)	0	0	0
Spider-Agar (37 °C, 5% CO ₂)	0	0	+
Wasseragar + 10% FBS (37 °C)	0	0	0
YPD (37 °C)	0	0	0
YPD (37 °C, 5% CO ₂)	0	0	0
Flüssig YPD + 10% FBS (37 °C)	0	0	0
Chlamydosporenbildung			
Maismehlagar und Reisagar (27 °C)	0	0	0
SLAD (27 °C)	0	0	0
Staibagar (27 °C)	0	0	0

Weder die *C. albicans* noch die *C. dubliniensis*-Transformanten zeigten messbare Veränderungen in der Hyphen- oder Chlamydosporenbildung unter den gewählten Testbedingungen (siehe Tabelle 8). Beispielhaft sind hier die Koloniemorphologien auf Spider-Agar (Abbildung 9) und die Chlamydosporenentwicklung der zu analysierenden Stämme auf Reis- und SLAD-Agar (Abbildung 10) dargestellt.

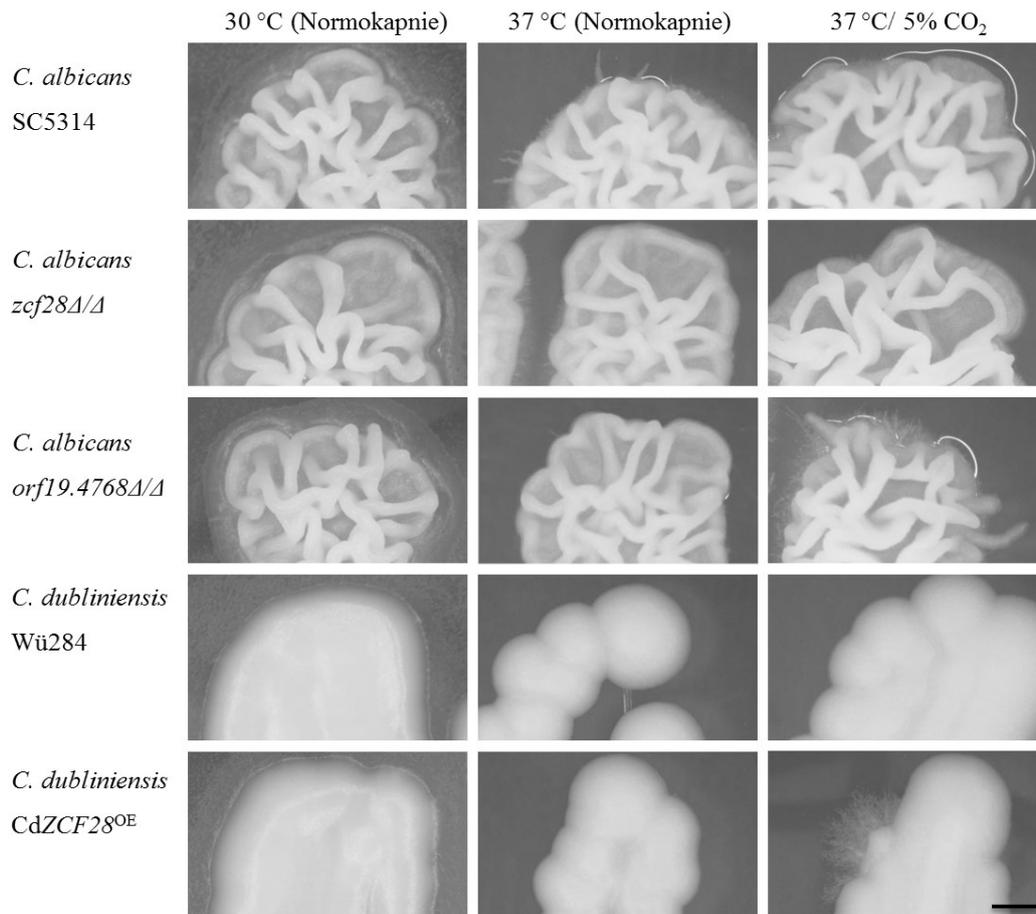


Abbildung 9 Koloniemorphologie der Wildtypstämme *C. albicans* SC5314 und *C. dubliniensis* Wü284 und den Mutanten *C. albicans* *zcf28Δ/Δ*, *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis* CdZCF28^{OE} auf Spider-Agar nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und CO₂-Konzentrationen. Während die *C. albicans*-Stämme unter allen Testbedingung in stark faltigen Kolonien wuchsen, blieben die *C. dubliniensis*-Kolonien weitestgehend glatt und afilamentös. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Der *C. albicans*-Wildtypstamm SC5314 sowie die Deletionsmutanten zeigten auf Spider-Agar eine starke Faltenbildung der Kolonien, die auf Filamentbildung hindeutet, bei 30 °C, 37 °C und in CO₂-angereicherter Atmosphäre. Bei 37 °C war zudem ein verstärkter Hyphenkranz, der zentrale Kolonien umgab, zu beobachten. Der Verlust der Gene *ZCF28* oder *orf19.4768* hatte also keinen Einfluss auf den Hefe-zu-Hyphe-Übergang in *C. albicans* unter den gewählten Testbedingungen. Eine eingeschränkte Fähigkeit zur Hyphenbildung ist charakteristisch für *C. dubliniensis*. Dies bestätigte sich darin, dass der *C. dubliniensis*-Wildtypstamm Wü284 unter allen Bedingungen in Hefeform wuchs und glatte Kolonien bildete. Der heterologe Überexpressionsstamm verhielt sich im Allgemeinen wie der Parentalstamm. Einzig eine Inkubation bei 37 °C mit dem zusätzlichen Hypheninduktor von 5% CO₂ führte zu einer partiellen Filamentbildung am Rand der Kolonien des CdZCF28^{OE}-Stammes (Abbildung 9).

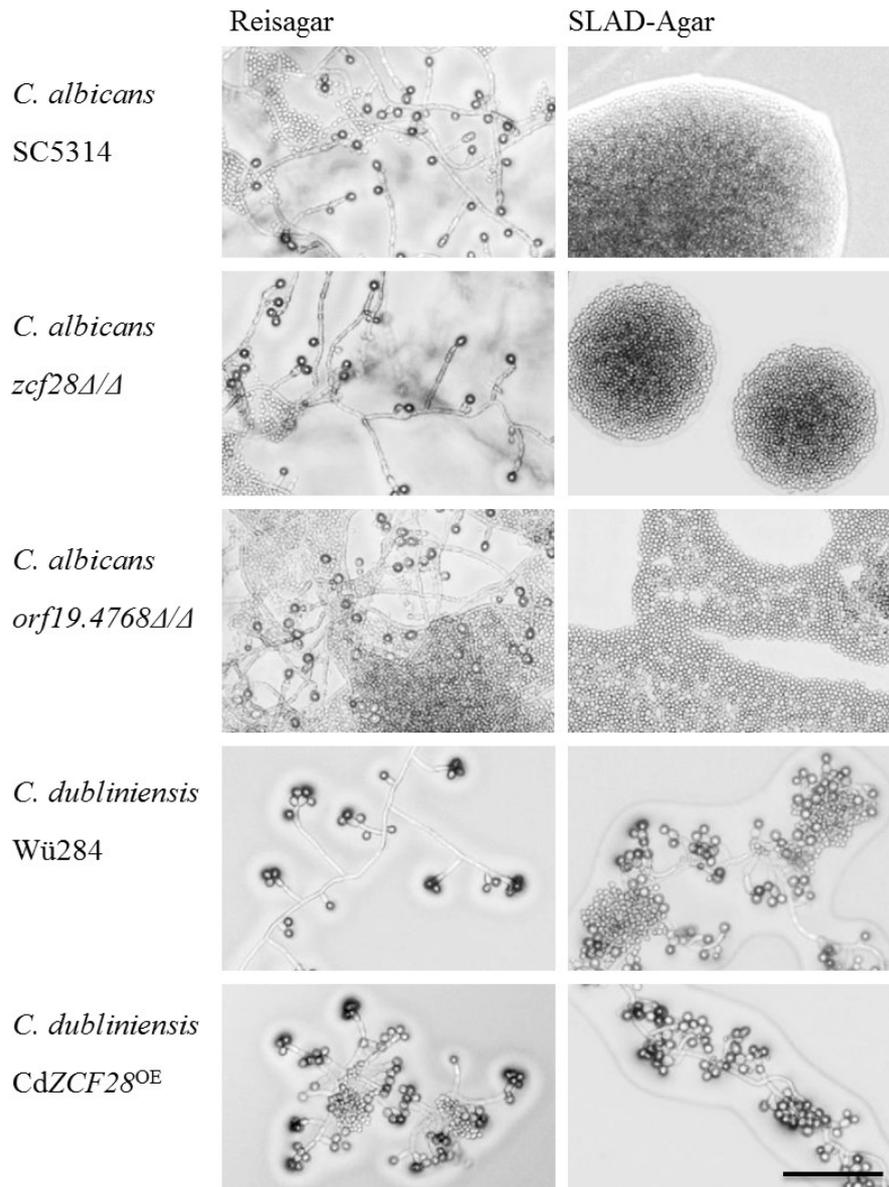


Abbildung 10 Chlamydosporenbildung der Stämme *C. albicans* SC5314, *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis* Wü284 und *CdZCF28^{OE}*. Die *Candida*-Stämme wurden 7 Tage bei 27 °C in Dunkelheit inkubiert und mikroskopisch dokumentiert (Axiovert, Zeiss, Göttingen, Deutschland), dabei wurden keine phänotypischen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Transformantenstämmen festgestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μM.

Die Chlamydosporenbildung wurde auf generellen und artspezifischen Induktionsmedien untersucht. Auf Reis- und Maismehlagar war es allen getesteten *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämmen möglich, nach einer siebentägigen Inkubation uneingeschränkt eine große Menge von Chlamydosporen zu bilden (Abbildung 10). Die Verwendung von SLAD- und Staib-Agar bestätigte die *C. dubliniensis*-spezifische Chlamydosporulation, die unabhängig von der *ZCF28*-Expression blieb. Somit haben die *C. albicans*-Gene *ZCF28* und *orf19.4768* keinen entscheidenden Einfluss auf den umweltabhängigen Polymorphismus dieses Pilzes.

6.1.3 Biofilmbildung

Für den Transkriptionsfaktor Zcf28 wurde eine wichtige Rolle im Zusammenspiel mit Csr1 während der Adhäsion von *C. albicans* an Silikonoberflächen beschrieben [89]. Das Anheften an Oberflächen ist der erste Schritt während der mikrobiellen Biofilmbildung und im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die Biofilme der Stämme *C. albicans* SC5314, *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* sowie *C. dubliniensis* Wü284 und *CdZCF28^{OE}* hinsichtlich ihrer Biomasse und der metabolischen Aktivität charakterisiert. Die Experimente zur Biofilmbildung wurden von Christine Pöllath im Zuge ihrer Masterarbeit, welcher die Details zur experimentellen Durchführung zu entnehmen sind [147], unter der Betreuung von Bettina Böttcher durchgeführt. Eine Kristallviolettfärbung ermöglichte die Ermittlung der Biomasse und mittels XTT-Analyse wurde die metabolische Aktivität der Zellpopulation bestimmt. Beide Testverfahren nutzen chromogene Substanzen, so dass die Quantifizierung photometrisch erfolgte [208].

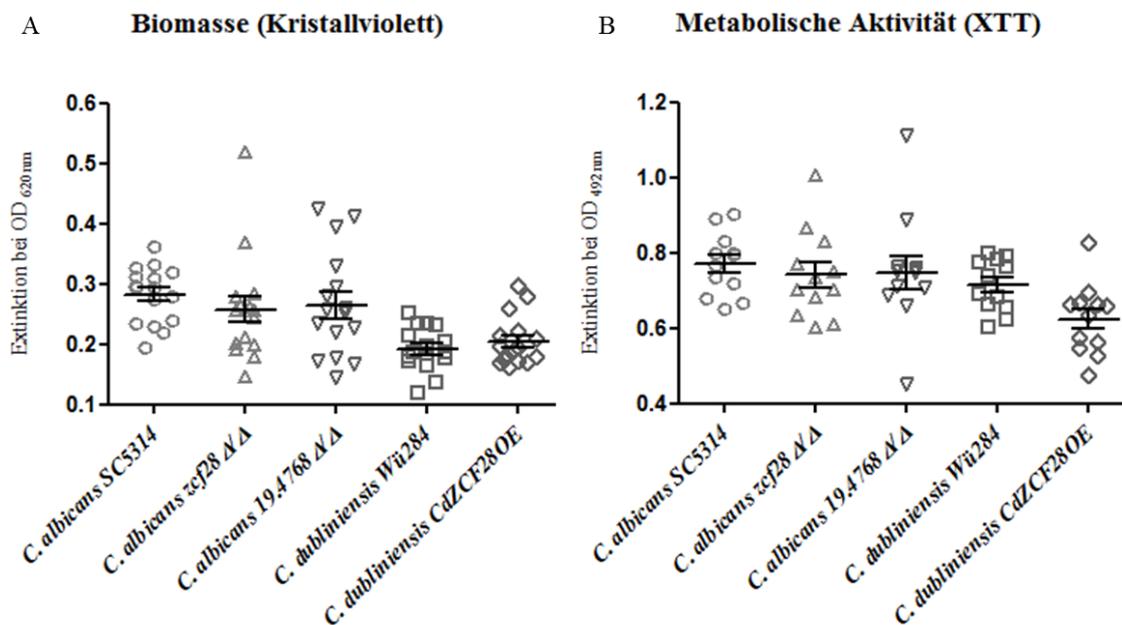


Abbildung 11 Dotplot-Diagramm (mit Mittelwert und Standardabweichung) zur Charakterisierung der Biofilme der Stämme *C. albicans* SC5314, *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis* Wü284 und *CdZCF28^{OE}* mittels (A) Kristallviolett- und (B) XTT-Assays. Der Vergleich der Transformantenstämme mit ihrem jeweiligen Elternstamm zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey-Test als Posthoc-Verfahren, drei biologische Replikate). Die Daten wurden von C. Pöllath im Rahmen ihrer Masterarbeit [147] erhoben und hier zusammenfassend dargestellt.

Der Vergleich der *Candida*-Wildtypstämme zeigte erwartungsgemäß für *C. albicans* eine um 32% höhere Biofilmmasse (Abbildung 11A) und 11% höhere metabolische Aktivität als *C. dubliniensis* (Abbildung 11B). In der Biomassebildung war bei beiden Spezies kein Unterschied zwischen den Transformanten- und Wildtypstämmen zu erkennen. Darüber hinaus war auch die mittels XTT-Test gemessene metabolische Aktivität weitestgehend zwischen Mutanten und Wildtypstämmen vergleichbar, allerdings betrug die Aktivität des *ZCF28*-Expressionsstammes nur 87% der Aktivität des *C. dubliniensis*-Wildtyps. Diese Reduktion war zwar tendenziell erkennbar, jedoch statistisch nicht signifikant.

6.1.4 Die Rolle der Gene *ZCF28* und *orf19.4768* unter infektionsassoziierten Bedingungen

Trotz ihrer engen genetischen Verwandtschaft unterscheiden sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* signifikant in ihrer Epidemiologie und ihrer Potenz lebensbedrohliche, systemische Infektionen zu verursachen [132]. Die geringe Abundanz von klinischen *C. dubliniensis*-Isolaten wird auf das Fehlen oder die veränderte Expression genetischer Virulenzdeterminanten zurückgeführt [143]. Die *C. albicans*-spezifischen Gene *ZCF28* und *ORF19.4768* wurden deshalb mittels *ex vivo*- und *in vivo*-Infektionsmodellen auf ihre Beteiligung an der Pathogenese untersucht.

6.1.4.1 Infektion oraler Epithelzellen

Als relevantes Zellkulturmodell wurden humane orale Epithelzellen (TR146) gewählt, da sowohl *C. albicans* als auch *C. dubliniensis* gehäuft aus der Mundhöhle HIV-infizierter Patienten isoliert werden können [209]. Sowohl Moyes *et al.* [210] als auch unsere eigenen vorherigen Studien [211] zeigten für *C. dubliniensis* eine geringere Schädigung von oralen Epithelien. Aus diesem Grund wurde für die *C. albicans*-Stämme ein Infektionsmodus von 1 (Multiplizität der Infektion, MOI 1: im Schnitt wird jede Epithelzelle mit einer *Candida*-Zelle koinkubiert) gewählt, während für die Infektion mit *C. dubliniensis*-Stämmen eine höhere MOI von 10 gewählt wurde, um eine messbare Schädigung zu erhalten. Die Methodik basierte auf den Vorarbeiten von Wächtler *et al.* [30].

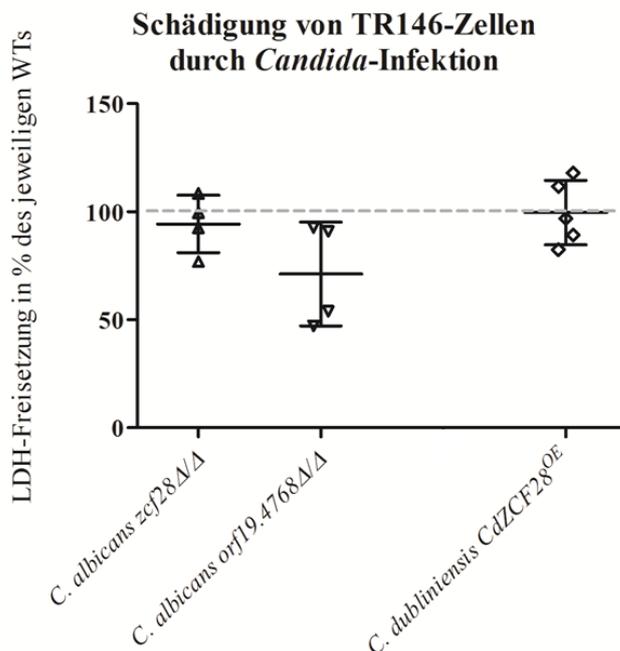


Abbildung 12 Laktat-Dehydrogenase-Assay zur Messung der Schädigung von TR146-Zellen durch die Infektion mit *C. albicans* SC5314, *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis* Wü284 und *CdZCF28^{OE}*, Darstellung mittels Dotplot-Diagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. Vor der Infektion wurden 10^4 TR146-Zellen je Well bis zur Konfluenz in 96-Well-Mikrotiterplatten inkubiert. Die Infektionsdosis variierte entsprechend des Parentalstammes mit einer MOI 1 für *C. albicans*-Stämme und MOI 10 für *C. dubliniensis*-Stämme und es wurde die prozentuale Schädigung der Transformanten zum Wildtypstamm dargestellt. Die statistische Analyse der Elternstämme mit den dazugehörigen Transformanten ergab keine signifikanten Unterschiede (Nicht-parametrischer Friedman-Test mit Dunn-Test als Posthoc-Verfahren, $n=4-5$).

Die vorherigen Analysen zur Stresssensitivität und Morphologie ergaben keine Hinweise auf eine entscheidende Rolle der Gene *ZCF28* und *orf19.4768* unter virulenzassoziierten Bedingungen. Dieses Verhalten konnte mit diesen *ex vivo*-Infektionen von humanen Epithelzellen bestätigt werden. Als Maß der Zellschädigung wurde die Konzentration der intrazellulären Laktat-Dehydrogenase im Mediumüberstand in einem kolorimetrischen Verfahren quantifiziert [30]. Sowohl die Deletion von *ZCF28* in *C. albicans* als auch die Genüberexpression im *C. dubliniensis*-Hintergrund veränderte die Pathogenität nicht, und die Schädigung der Wirtszellen blieb nahezu unverändert (Abbildung 12). Die *C. albicans orf19.4768Δ/Δ*-Mutante zeigte eine reduzierte mittlere Schädigung von 71,2% des Wildtypniveaus; jedoch betrug die Standardabweichung durch die biologische Variabilität bei diesen Tests 24%, wodurch eine endgültige Aussage über eine mögliche biologische Rolle des Gens bei der Infektion oraler Zellen nicht sicher getroffen werden kann.

6.1.4.2 Infektion embryonierter Hühnereier

Sowohl die *in vitro*- als auch *ex vivo*-Verfahren zur Charakterisierung der *Candida*-Mutanten können nur einen Ausschnitt einer realen Infektionssituation simulieren. Um ein komplexeres System einer Infektion zu untersuchen, wurde die Virulenz der *C. albicans zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ*-Deletionsstämme *in vivo* im alternativen Hühnerei-Infektionsmodell nach dem Protokoll von Jacobsen *et al.* [156, 184] getestet. Dazu wurde eine Infektionsdosis von 10^7 *Candida*-Zellen/Ei genutzt und das Überleben der Hühnerembryonen wurde über sieben Tage überwacht.

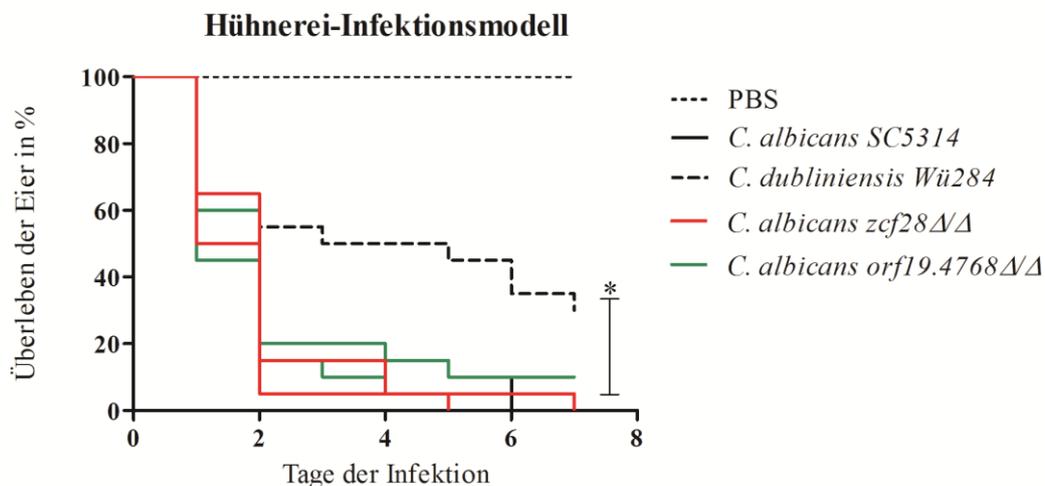


Abbildung 13 Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Hühnerembryonen nach der Infektion mit den Stämmen *C. albicans* SC5314, isogenen Mutanten von *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ* und *C. dubliniensis* Wü284 und der PBS-Negativkontrolle. Das Überleben nach Infektion mit *C. albicans* war unabhängig vom Stamm auf vergleichbarem Niveau, während die Überlebensrate der Embryonen nach einer *C. dubliniensis*-Infektion im Vergleich mit dem *C. albicans*-Wildtypstamm erwartungsgemäß signifikant ($P = 0,0117$) höher war (ermittelt mit dem Log-Rangsummen-(Mantel-Cox)-Test, $n=20$).

Die Infektion der embryonierten Hühnereier führte mit allen getesteten *C. albicans*-Stämmen jeweils zu einer hohen Mortalität von 90-100%. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Deletionsstämmen zu beobachten (Abbildung 13), wodurch die Rolle der

C. albicans-Gene *ZCF28* und *orf19.4768* auch in diesem Infektionsmodell als gering eingeschätzt werden konnte. Das Modell spiegelte zudem die speziesspezifische verminderte Virulenz [143, 173] des *C. dubliniensis*-Wildtypstamms Wü284 wider, der zum Endpunkt der Analyse eine Mortalität von 70% verursachte, was die Validität des verwendeten Systems für *Candida*-Infektionsversuche unterstützt. Die Injektion einer PBS-Lösung als Negativkontrolle hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Embryonen.

6.2 Screening von Interspezies-Genbibliotheken zur Identifikation potentieller Virulenzfaktoren

Ein Hauptteil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifikation von *C. dubliniensis*- bzw. *C. albicans*-spezifischen Genen, die Verknüpfungen mit der charakteristischen Pathobiologie erlauben. Mit der Analyse einer genomischen *C. albicans*-Bibliothek konnte im Manuskript 4 erfolgreich ein neuartiger virulenzrelevanter Faktor identifiziert und typisiert werden. Für eine Entdeckung von weiteren spezifischen Genen wurden zwei Genbibliotheken umfassend untersucht und deren Screeningresultate wurden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

6.2.1 Screening der *C. albicans*-Genbibliothek in *C. dubliniensis* auf diversen Differenzierungsmedien

Der Fokus lag auf einer Genbibliothek von genomischen *C. albicans*-DNA-Fragmenten, die in *C. dubliniensis* integriert wurden, um Transformanten mit einem *C. albicans*-dominanten Phänotyp zu selektieren [62]. Die Bibliothek wurde unter folgenden Bedingungen analysiert: erhöhte Temperatur (42 °C) osmotischer Stress (1,1 M NaCl und 0,4 M LiCl), oxidativer Stress (10 mM H₂O₂), Zellwandstress (20 mM Calcofluor White), *C. albicans*-spezifische Hypheninduktion (Kochblutagar) und *C. dubliniensis*-spezifische chlamydosporeninduzierende Bedingungen (Staib-Agar, SLAD-Agar, Casein-Agar). Unter jeder Bedingung wurden ca. 20.000 verschiedene Klone phänotypisch analysiert. Mit Ausnahme des Temperatur- und des oxidativen Stresses konnten unter allen getesteten Bedingungen Transformanten mit einem verifizierbarem Phänotyp isoliert werden. Bedingt durch das gehäufte Auftreten von Sekundärstrukturen und AT-reichen Regionen in den übertragenen DNA-Fragmenten aus dem *C. albicans*-Genom, konnte nicht allen *Candida*-Isolaten eine Sequenz zugeordnet werden. In Tabelle 9 sind die erfolgreich identifizierten *C. albicans*-Gene und die zugehörigen Selektionsbedingungen aufgelistet. Ausgewählte Gene, die bisher wenig oder gar nicht charakterisiert waren, wurden zur näheren Analyse einzeln in den parentalen *C. dubliniensis* Stamm reintegriert.

Tabelle 9 Die genomische *C. albicans*-Bibliothek wurde unter Bedingungen, unter welchen sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* normalerweise phänotypisch unterscheiden, gescreent. Es konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die unter den Selektionsbedingungen einen *C. albicans*-typischen Phänotyp in *C. dubliniensis* hervorriefen. Die zur weiteren Analyse in den parentalen *C. dubliniensis*-Stamm reintegrierten Gene sind fett hervorgehoben.

Screeningbedingung	Identifizierte <i>C. albicans</i> -Gene
NaCl	VPS15 , <i>MNN47</i> , <i>orf19.213</i> , <i>VPS28</i> , <i>orf19.211</i>
LiCl	<i>orf19.4280</i> , IFH1 , <i>orf19.4283</i> ,
Calcofluor White	VIP1 , <i>orf19.607</i> , <i>orf19.6701</i>
Kochblutagar	<i>orf19.1426</i>
SLAD-Agar	orf19.2113 , orf19.2114 , orf19.2115 , <i>orf19.2332</i> , ADA2 , <i>orf19.2329.1</i>
Casein-Agar [147]	UTP6 , ADA2 , orf19.2332 , SSY5 , FBP26 , UBC9 , SKI2

C. dubliniensis-Transformanten mit einer Einzelintegration des *C. albicans*-Gens wurden erneut auf dem ursprünglichen Selektionsmedium untersucht. Dabei war die Reproduktion der ursprünglichen Phänotypen in den allermeisten Fällen nicht möglich. Möglicherweise wurde der zuvor beobachtete Phänotyp durch die Kombination mehrerer Gene, durch Veränderungen der Chromatinstrukturen oder durch andere epigenetische Modifikationen beeinflusst. Allein der *C. dubliniensis*-Stamm, der das *C. albicans*-Gen *orf19.2115* trägt, wies stabil und reproduzierbar die morphologischen Veränderungen hin zu *C. albicans*-typischen Phänotypen auf. Einzelheiten zur Identifizierung und der funktionellen Charakterisierung des Gens sind zentrale Bestandteile des Manuskripts 4 [212].

6.2.2 Das Screening der *C. dubliniensis*-Genbibliothek in *C. albicans* demonstriert die Rolle von *MNN2* auf die Filamentierung auf Stickstoffmangelmedium

6.2.2.1 Identifizierung des Gens *CD36_10050* als Induktor der Filamentierung

In einem zweiten Versuchsansatz wurde eine genomische Bibliothek von *C. dubliniensis* DNA-Fragmenten in *C. albicans*-Transformanten auf SLAD-Agar gescreent. Das Screening und die Selektion von Genbanktransformanten wurden analog zu den Arbeiten mit der *C. albicans*-Genbank [62, 212] durchgeführt.

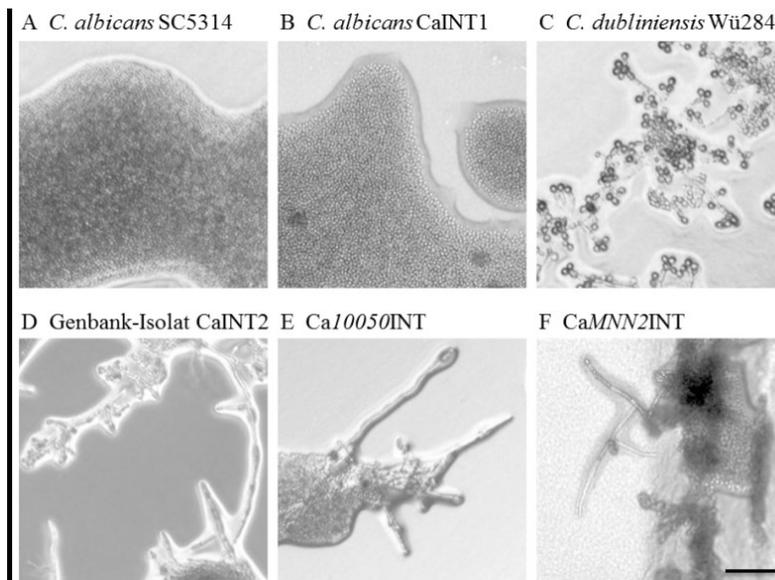


Abbildung 14 Koloniemorphologie der Stämme *C. albicans* SC5314, CaINT1, CaINT2, Ca10050INT und CaMNN2INT und *C. dubliniensis* Wü284 auf SLAD-Agar. Die Kulturen wurden 48 h bei 30 °C inkubiert und mikroskopisch analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µM.

Wie zuvor beschrieben, bildet der *C. dubliniensis*-Wildtyp auf dem Stickstoffmangelmedium SLAD-Agar bei 27-30 °C Pseudohyphen mit terminalen Clustern aus Chlamydosporen [155], während *C. albicans*-Wildtypstämme in Hefeform wachsen (Abbildung 14A-C). Durch die phänotypische Untersuchung von ca. 20.000 *C. albicans*-Transformanten mit eingebrachten *C. dubliniensis*-Genen auf SLAD-Agar konnten Kolonien mit erhöhtem Filamentierungsverhalten isoliert werden, allerdings immer ohne Chlamydosporenbildung. Die Transformante CaINT2 zeigte stabil eine hyperfilamentöse Wuchsform (Abbildung 14D). Wie im Abschnitt 5.4.2 beschrieben wurde, trug der Klon CaINT2 das *C. dubliniensis*-Gen *CD36_10050* als einzigen offenen Leserahmen des integrierten DNA-Fragments. In den *C. albicans*-Ausgangsstamm CAI4 wurde daher sowohl das *C. dubliniensis*-Gen *CD36_10050* als auch dessen *C. albicans*-Ortholog *MNN2* jeweils am selben Ort integriert. Die resultierenden Stämme Ca10050INT und CaMNN2INT zeigten auf SLAD-Agar ebenfalls einen Trend zur verstärkten Filamentierung. Während CaINT2 und Ca10050INT in der Lage waren auch echte Hyphen zu induzieren (Abbildung 14D, E), beschränkte sich die Morphologie des CaMNN2INT-Stammes auf Pseudohyphen und Klumpungen von Hefen (Abbildung 14F). Der *C. dubliniensis*-spezifische Phänotyp basierte also nicht ausschließlich auf der Gendosis des *MNN2/CD36_10050*-Orthologenpaars, sondern konnte spezifisch durch die heterologe Expression der *C. dubliniensis*-Gene in *C. albicans* erzielt werden.

6.2.2.2 Charakterisierung der *C. albicans* *CD36_10050* und *MNN2*-Expressionsmutanten unter speziesdistinktiven Bedingungen

Da die *C. albicans*-Mutanten Ca10050INT und CaMNN2INT bei Inkubation auf SLAD-Agar in der Lage waren das filamentöse Wachstum, aber nicht die Chlamydosporenbildung, von *C. dubliniensis* zu phänotypisch kopieren, wurden weitere Bedingungen getestet unter welchen die beiden Arten unterscheidbar sind.

Resistenz gegen Stressoren

Ein hervorstechender Unterschied zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist die verminderte Thermoresistenz des letzteren [145]. Deshalb wurde das Wachstum von Wildtyp- und Expressionsstämmen auf YPD-Platten nach drei Tagen Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen (Abbildung 15).

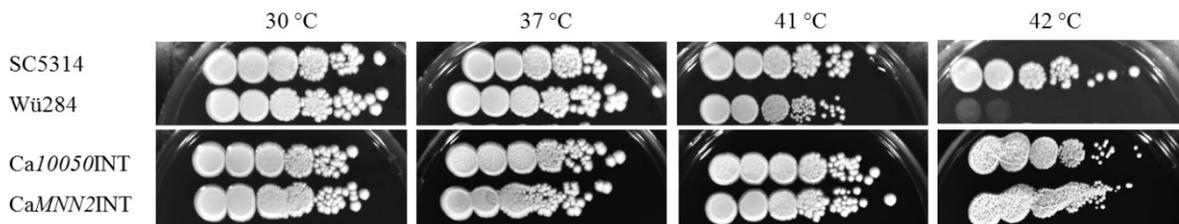


Abbildung 15 Tropftestanalyse der Stämme *C. albicans* SC5314, *Ca10050INT* und *CaMNN2INT* und *C. dubliniensis* Wü284 nach drei Tagen Inkubation unter aufsteigenden Temperaturen. Zwischen den *C. albicans*-Stämmen war kein Unterschied in der Wachstumskapazität sichtbar, hingegen zeigte *C. dubliniensis* bei 42 °C die artspezifische Hitzesensitivität.

Die Temperaturresistenz der Expressionsstämme entsprach unter allen Testtemperaturen derer ihres parentalen *C. albicans*-Wildtyps. Die Integration der Gene *CD36_10050* und *MNN2* in *C. albicans* hatte also keinen Einfluss auf die Temperaturtoleranz.

Der Effekt von chemischen Stressoren wurde in Form von Wachstumskurven mit folgenden Zusätzen zum YPD-Medium gemessen: Koffein, NaCl, LiCl, Fluconazol und CuSO₄. Bei allen getesteten Stressoren war die intrinsische Resistenz des *C. dubliniensis*-Stamms Wü284 geringer als die des *C. albicans*-Wildtyps SC5314 sowie der Expressionsmutanten. Allein bei der Zugabe von 5 mM CuSO₄ wurde eine leicht erhöhte Resistenz beider Expressionsmutanten *Ca10050INT* und *CaMNN2INT* gegenüber dem *C. albicans*-Wildtyp gemessen, was auf einen Gendosiseffekt hindeuten kann (Daten nicht dargestellt).

Morphologische Tests

Bei den Temperaturstresstests fiel eine Veränderung der Koloniemorphologie der Expressionstransformanten auf: Die Stämme *Ca10050INT* und *CaMNN2INT* zeigten im Gegensatz zum *C. albicans*-Wildtyp eine ausgeprägte Faltenbildung nach Inkubation bei 37 °C/ 5% CO₂ und bei 42 °C (Abbildung 16), die auf eine verstärkte Filamentierung im Koloniezentrum schließen lässt. Auch bei 37 °C (ohne zusätzliches CO₂) und bei 41 °C (der höchstmöglichen Temperatur für *C. dubliniensis*-Wachstum) waren diese phänotypischen Veränderungen zu beobachten, wenn auch in einem weitaus geringerem Maße. Der direkte Vergleich von *Ca10050INT* und *CaMNN2INT* zeigte, dass *Ca10050INT* eine ausgeprägtere Rauigkeit der Kolonien aufwies, doch trat bei keinem der untersuchten Stämme eine radiale Hyphenbildung auf. Dies steht im Einklang mit der Hyphenbildung auf SLAD-Agar, die auch nach der Integration des *C. dubliniensis*-Orthologs stärker war. Die erhöhte Koloniefaltung der Expressionsstämme zeigte ein generell gesteigertes Vermögen zur Filamentbildung

und dadurch konnte, mit dem *MNN2*-Mannosyltransferasegens, erfolgreich ein weiterer Faktor der morphologischen Verwandlungen identifiziert werden. Da die Genfamilie von Mannosyltransferasen in *C. albicans* bereits intensiv untersucht worden ist und sie durch ihre Rolle in der Filamentierung und Immunzellerkennung bekannte Faktoren der fungalen Virulenzmechanismen darstellen [213, 214], wurde die Genidentifikation in dieser Arbeit einerseits als positive Validierung des methodischen Ansatzes bewertet und andererseits wurden die bekannten Phänotypen durch einen alternativen Versuchsaufbau bestätigt.

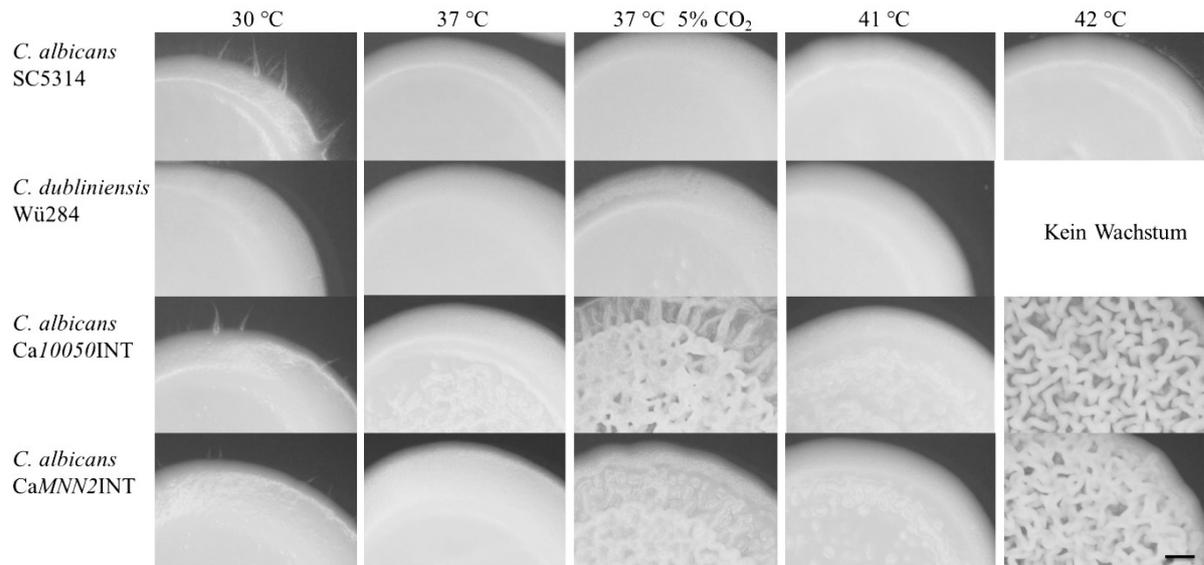


Abbildung 16 Koloniemorphologie der Stämme *C. albicans* SC5314, Ca10050INT und CaMNN2INT und *C. dubliniensis* Wü284 bei verschiedenen Temperaturen und unter Normokapnie wenn nicht anderes gekennzeichnet. Nach einer dreitägigen Inkubation wurde die makroskopische Morphologie mittels Binokular (Stemi 2000-C, Carl Zeiss Microscopy GmbH) begutachtet. Maßstabsbalken: 1mm.

7 Diskussion

Sowohl *C. dubliniensis* als auch *C. albicans* sind häufige harmlose Kommensale im Gastrointestinaltrakt und auf Schleimhäuten gesunder Menschen, die jedoch selbst bei wenig immunkompromittierten Patienten oberflächliche, in schweren Fällen auch systemische lebensbedrohliche Infektionen verursachen können. Im Vergleich zu *C. albicans* wird *C. dubliniensis* 30-fach seltener aus Blutproben von Patienten isoliert [137] und auch die Schwere des Krankheitsbildes der *Candida*-Infektionen unterscheidet sich charakteristisch. Sowohl die genetische Colinearität, als auch die Sequenzidentität sind sehr hoch [135], so dass die engen genetischen Verwandtschaftsverhältnisse eine vergleichende Analyse von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ermöglichen, um grundlegende Erkenntnisse zur Virulenz dieser Pilze zu erhalten. Beispielsweise gehören zu den markanten Unterschieden *C. albicans*-eigene, hyphenassoziierte Virulenzfaktoren [135, 143, 162]. Neben diesen speziesspezifischen Genen sind besonders auch speziesspezifische Anpassungen von Genregulationsnetzwerken als Antwort auf Umweltbedingungen von Interesse.

Die molekularen Ursachen der phänotypischen und infektiologischen Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser verwandten *Candida*-Arten wurden hier anhand der Hungerantwort und der Regulation der Morphogenese, zweier wichtiger Faktoren in der Pathobiologie von *Candida*-Spezies, untersucht. Zusammenfassend beinhaltet dies drei Hauptaspekte 1.) die Speziespezifität von transkriptionellen Regulatoren und ihrer Netzwerke, 2.) die molekulare Basis der Unterschiede in der Chlamydosporenbildung und 3.) die Aufschlüsselung von cotranslationalen Mechanismen in der Morphogenese über einen Speziesvergleich.

Für den ersten Aspekt, die Ebene der Transkriptionsfaktoren, wurden die Orthologe eines Regulators in beiden Spezies auf ihre gemeinsamen und spezifischen Funktionen hin untersucht (Manuskript 1: Die Funktion von *Csr1* in *C. dubliniensis*), und zudem speziesspezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert und bezüglich spezifischer virulenzassoziierter Charakteristika analysiert (Abschnitt 6.1 Charakterisierung der *C. albicans* Gene *ZCF28* und *orf19.4768*).

C. albicans und *C. dubliniensis* vereint ein ausgeprägter Polymorphismus, der sie von anderen *Candida*-Spezies abgrenzt. Trotzdem gibt es Unterschiede in der Hyphen- und Chlamydosporenbildung, die als phänotypisch deskriptive Merkmale unter anderem in der klinischen Diagnostik genutzt, um diese beiden Arten zu unterscheiden [130, 148, 203]. Während die Hyphenbildung das wohl am besten charakterisierte Attribut von *C. albicans* ist (> 2900 Veröffentlichungen indiziert in Pubmed, Stand Juni 2017), ist die Chlamydosporenbildung vergleichsweise wenig erforscht (143 Pubmed-Einträge), auch weil bis heute ihre biologische Funktion nicht geklärt ist. Vor diesem Hintergrund wurde für den zweiten Untersuchungspunkt die Chlamydosporenbildung erstmals transkriptionell (Manuskript 2: Chlamydosporen-spezifische Marker) als auch auf regulatorischer Ebene (Manuskript 3: Regulation der Chlamydosporenbildung) systematisch untersucht.

Hinsichtlich des dritten Aspekts wurde die artspezifische morphologische Antwort auf Nährstoffmangel untersucht, indem ein Screening einer heterologen Genbibliothek unter Stickstoffhungerbedingungen durchgeführt wurde. Dies resultierte in der Entdeckung eines tRNA-

modifizierenden Enzyms als Regulator der artspezifischen Morphologien unter diesen Bedingungen. So konnte erstmals der Einfluss von tRNA-Basenmodifikationen auf die Expression von virulenzassoziierten Merkmalen in einem pilzlichen Krankheitserreger nachgewiesen werden (Manuskript 4: tRNA-Modifikationen als Virulenzdeterminante in *C. albicans*). Komplementär dazu wurde bei der Analyse des genetischen Hintergrunds von pathogenen *S. cerevisiae*-Isolaten eine hyperaktive Genvariante eines tRNA-modifizierenden Enzyms als Ursache für ihr erhöhtes Virulenzpotenzial beschrieben [215]. Dadurch kann die Spezifität von tRNA-Modifizierungsmustern als generell konservierter Mechanismus, mit entsprechend speziesspezifischen Anpassungen, in der Virulenz von Pilzen vermutet werden.

7.1 Transkriptionskontrolle in *C. albicans* und *C. dubliniensis* am Beispiel ausgewählter Zinkfingertranskriptionsfaktoren

Pathogene Mikroorganismen müssen sich rasch an wandelnde Umweltbedingungen und verschiedene Wirtsnischen anpassen, um ihr Überleben und ihr Wachstum zu gewährleisten. Zu den schnellen Reaktionen zählt dabei die plastische Genexpression über verschiedene Transkriptionsfaktoren. Neuartige Verschaltungen regulatorischer Komponenten können dabei über evolutionäre Zeiträume phänotypische Diversität erzeugen und durch Selektion die Besiedlung neuer Nischen erlauben – bis hin zur Aufspaltung in neue Arten [216]. Die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren ist daher ein vielversprechender Ausgangspunkt zur Charakterisierung einer artspezifischen Anpassung von *Candida*-Spezies. Obwohl die zentralen Stoffwechselwege in Pilzen weitgehend konserviert sind, unterscheiden sich beispielsweise *C. albicans* und die Bäckerhefe *S. cerevisiae* in der Regulation der Metabolisierung alternativer Kohlenhydratquellen. Während der Zn₂Cys₆-Transkriptionsfaktor Gal4 in *S. cerevisiae* Gene der Galaktoseverwertung steuert [205], reguliert der orthologe Faktor die Glykolyse in *C. albicans* [217]. Transkriptionsfaktoren sind funktionell und strukturell vielfältig. Die Zinkfingertranskriptionsfaktoren sind dabei die verbreitetste Familie innerhalb der Eukaryoten. Sie binden Zinkionen über funktionelle Histidin- und Cysteingruppen und stabilisieren die Protein-DNA-Wechselwirkung [95]. Nach der Fungal Transcription Factor Datenbank umfasst das *C. albicans*-Genom 116 dieser Expressionsregulatoren [218], von denen hier drei Faktoren ausgewählt und in einem zwischenartlichen Vergleich charakterisiert wurden.

7.1.1 Konservierte und artspezifische Funktionen des transkriptionellen Regulators Csr1 in *C. dubliniensis*

Sowohl Mangel als auch Überschuss an Zink sind zelltoxisch, weshalb eine enge Regulation der Zinkhomöostase essentiell ist. Der C₂H₂-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Zap1 in *S. cerevisiae* (entspricht Csr1 in *Candida*-Arten) ist dabei der zentrale Regulator des Zinkhaushalts, der die Expression von Faktoren des Zinkimports und –exports steuert [4, 83, 219].

Die transkriptionelle Regulation der Zinkhomöostase ist über Zap1-Homologe in vielen humanpathogenen Pilzgattungen aus den drei Hauptphyla *Mucormycotina*, *Basidiomycota* und *Ascomycota* konserviert [220]. Zap1 und seine Homologe haben aber auch im Laufe der Evolution in einzelnen Arten weitere Funktionen übernommen. Während in *S. cerevisiae* etwa 80 Gene durch ein

zinkspezifisches ZRE-Erkennungsmotiv in den Promotorbereichen unter der Kontrolle von Zap1 stehen [221], sind in *C. albicans* mehr als 270 Zielgene bekannt, die auch unter induzierenden Bedingungen nicht in *csr1Δ/Δ*-Deletionsmutanten heraufreguliert werden [88]. Neben Genen der Zinkantwort zählen dazu auch Adhäsine und weitere Faktoren der Biofilmbildung sowie Induktoren der Hyphenbildung. Zudem wurde eine aktivierende Rolle während der Farnesolakkumulation beschrieben [87, 88, 222]. Eine schnelle Expressionssteigerung von *CSRI* und seiner zinkrelevanten Zielgene wurde sowohl in *C. albicans* während der Kolonialisierung von Mausnieren zwölf Stunden p.i. [169] als auch in *C. dubliniensis* unter *in vitro*-Zinkmangelbedingung innerhalb der ersten vier Stunden beobachtet [156]. Möglicherweise greifen auch in *Candida*-Arten Mechanismen einer verstärkenden transkriptionellen Autoregulation, die für *ZAP1* in *S. cerevisiae* untersucht wurden [219]. Das Zap1-Protein in der Bäckerhefe ist durch drei Domänen gekennzeichnet: Zwei Aktivierungsdomänen, die in den untersuchten *Candida*-Spezies fehlen, und eine DNA-Bindungsdomäne, welche aus zumeist sieben C₂H₂-Zinkfingermotiven besteht [4, 223]. Diese Cystein-Histidin-reichen Regionen binden zweiwertige Zinkionen und sind in Zap1-ähnlichen Faktoren, einschließlich Csr1 der analysierten *Candida*-Spezies, evolutionär erhalten [4, 82, 156]. Die Unterschiede in den Modulen von Csr1/Zap1 weisen bereits auf eine funktionelle Reorganisation zwischen *Candida*- und *Saccharomyces*-Arten hin. Posttranslational wird die Zap1-Aktivität in *S. cerevisiae* über die Verfügbarkeit an zellulärem Zink gesteuert. Während die DNA-Bindungselemente stets Zink als Cofaktor gebunden haben, ist die Zinkbindung an den Aktivator-domänen von intrazellulären Zinkkonzentration abhängig, und sie sind allein unter Zinkdefizit funktionell aktiv [224]. Bei Zinkaufnahme kommt es zu einer negativen Rückkopplung, wodurch ein Zinküberschuss zur Anreicherung von inaktiven Zap1-Molekülen führt, die die eigene Genexpression verhindern. Damit ist der Mechanismus der Zinkhomöostase in der Bäckerhefe beispielhaft für eine Verknüpfung transkriptioneller und posttranslationaler regulatorischer Ebenen, die eine präzise Genexpression und Adaptation unter Stressbedingungen ermöglicht.

Während die basalen Regulations- und Transportkomponenten des Zinkhaushalts konserviert sind, konnten im Manuskript 1 neben den Parallelen auch Unterschiede des Zinkimports in *C. dubliniensis* im Vergleich zu *C. albicans* sowie *S. cerevisiae* aufgezeigt werden. Die wichtigste Gemeinsamkeit ist die Bedeutung von Csr1 unter Zinkmangel, die als evolutionär konserviert betrachtet werden kann. Eine *C. dubliniensis csr1Δ/Δ*-Deletionsmutante war nicht in der Lage unter Zinkmangel zu wachsen, und transkriptionell wurde nachgewiesen, dass ein Verlust des Regulators die Transkription der Zinktransportergene *ZRT1-3* und des Zinkophorgens *PRA1* signifikant verringert [156, 225]. Während in *S. cerevisiae* Zrt1 als Hochaffinitätstransporter für den effizienten Zinkimport unter starkem Zinkmangel induziert wird [226], wurde diese Rolle in *C. dubliniensis* von Zrt2 übernommen. So konnte durch die künstliche Überexpression von *ZRT2*, aber nicht *ZRT1*, die Proliferation einer *C. dubliniensis csr1Δ/Δ*-Deletionsmutante unter minimaler Zinkkonzentration wieder hergestellt werden. In *C. albicans* ist die Überexpressionen von *ZRT1* oder *ZRT2* ausreichend, um einen Csr1-Defekt auszugleichen [88]. Im direkten Vergleich bestätigte sich somit die enge Verwandtschaft der *Candida*-Arten in den konservierten Funktionen von Csr1 und Zrt2, doch scheint CdZrt1 Zink weniger

effizient zu transportieren als CaZrt1. *ZRT2* in *S. cerevisiae* unterscheidet sich auch in den nicht-kodierenden Nukleotidsequenzen von den *Candida*-Orthologen [156], sodass der ScZRT2-Promotorbereich repressive Elemente trägt, die durch Zap1 gebunden werden und die *ZRT2*-Transkription unter strenger Zinklimitierung vermeiden [227]. Ein weiterer gattungsspezifischer Unterschied ist der Wachstumsdefekt einer *S. cerevisiae zap1Δ*-Mutante in Vollmedium [228], der bei *Candida*-Deletionsmutanten nicht auftritt.

Weitere evolutionäre Neuerschaltungen des Csr1-Regulons zeigt die Expansion von Zielgenen, die auch *C. albicans*-spezifische Faktoren der Hyphen- und Biofilmbildung wie *ZCF28*, *SAP5* und *HYR1* umfassen [88, 89]. Diese genetische Varianz führte zu dem artspezifischen Verlust der Filamentierung in *C. albicans*, aber nicht in *C. dubliniensis csr1Δ/Δ*-Deletionsmutanten [4, 88, 156]. Im Vergleich zum gemeinsamen Vorläufer unterlag *C. dubliniensis* einer reduktiven Evolution, die sich im Wegfall wichtiger hyphenassoziierte Gene zeigt [135, 143]. Andere Faktoren teilen Orthologe in *C. albicans* und *C. dubliniensis*, aber sie sind strukturell oder funktionell divergent. Beispiele sind Hwp1, Ume6 und Nrg1. Mit den hier gezeigten Ergebnissen kann nun auch Csr1 – in seiner Rolle bei der Filamentierung – dazugezählt werden [65, 66, 135, 156].

Die Akquise von Mikronährstoffen wie Zink ist ein essentieller Virulenzmechanismus von mikrobiellen Pathogenen [71, 72]. Daher verursacht der Verlust der Csr1-Orthologe Zap1 oder ZafA bei Mäusen mildere Krankheitsverläufe von Cryptococcosis- bzw. Aspergillosisinfektionen [229, 230]. Ähnlich wie in den *C. albicans*-Infektionsstudien [169] führte der Wegfall von Csr1 auch in *C. dubliniensis* zu einer signifikanten Verminderung der Virulenz in einem Hühnerembryonen-Infektionsmodell, die bemerkenswerterweise von der Filamentierungsfähigkeit entkoppelt war [156]. In der Studie von Xu *et al.* wurden *C. albicans*-Deletionsmutanten von früh transkribierten, infektionsrelevanten Genen einschließlich *CSRI* auf ihr Verhalten und ihre Expressionsprofile *in vivo* detailliert untersucht. Erstaunlicherweise phänotypisierte die Deletionsmutante eines Transkriptionsfaktors der Sterolsynthese Sut1 das Expressionsmuster des *csr1Δ/Δ*-Stamms *in vivo* und die Attenuierung beider Stämme konnte jeweils durch eine *ZRT2*-Überexpression auf das Level der wildtypischen Mortalität angehoben werden [169]. Die enge Korrelation einer *ZRT2*-Expression und der Mortalität bekräftigt die Bedeutung der Zinkaufnahme während der pilzlichen Pathogenese. Da interessanterweise eine *sut1Δ/Δ*-Mutante *in vitro*-Zinkmangelbedingungen toleriert, ist dieses Phänomen ein gutes Beispiel für die nischenspezifische Genexpression.

Die Zinkhomöostase kann auch eine Rolle in der Immunevasion durch Pilze spielen. Das antifungale Effektmolekül Perforin beispielsweise bildet durch Oligomerisation Poren innerhalb von Membranen, die möglicherweise durch Einlagerung von Zink oder anderen zweiwertigen Ionen verschlossen werden können: ein Mechanismus, der für andere porenbildende Toxine bereits gezeigt wurde [231, 232]. Vor kurzem wurde ein morphologischer Effekt beschrieben, bei dem in Gegenwart von Perforin die Keimschläuche von *C. albicans* verkürzt und zugleich *ZRT1* und *PRA1* heraufreguliert waren [233]. Insbesondere in *C. dubliniensis*, wo Csr1 anders als in *C. albicans* nicht die Filamentierung beeinflusst, könnte dieser Aspekt der Zinkhomöostase für die *in vivo* Virulenzdefekte der *csr1Δ/Δ*-Mutante eine wichtige Rolle spielen.

7.1.2 Die *C. albicans*-spezifischen Transkriptionsfaktoren Zcf28 und orf19.4768 sind wenig pathogenitätsrelevant

Zentrales Ziel der Arbeit war es, in *C. albicans* und *C. dubliniensis* artspezifische pathogenitätsassoziierte Faktoren zu identifizieren. Die NBLAST-Analyse ergab eine Reihe von *C. albicans*-Genen, die im *C. dubliniensis*-Genom fehlen [164]. Im Einklang mit früheren Analysen sind unter anderem die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren in *C. albicans* expandiert [135]. Unter den *C. albicans*-eigenen Transkriptionsfaktoren befinden sich die offenen Leserahmen *ZCF28* und *orf19.4768*, die in genomischer Nachbarschaft zu einander stehen.

Entgegen der Erwartung wurden für *C. albicans* *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ*-Deletionsmutanten sowie eine *C. dubliniensis* Cd*ZCF28*^{OE}-Expressionsmutante nur wenige signifikante phänotypische Veränderungen gefunden, was allerdings für *ZCF28* im Übereinstimmung zu anderen Arbeiten steht, bei denen Transposoninsertionsmutanten ebenfalls keine messbare Veränderung zum Wildtyp zeigten [96, 228].

Die genomische Colokalisation der beiden Gene spiegelte sich in Übereinstimmungen im phänotypischen Profil beider Deletionsstämme wider, was für Eukaryoten ungewöhnlich ist: Während Gene in Bakterien in funktionellen Operons strukturiert sind, liegen funktionell ähnliche eukaryotische Gene regelmäßig auf verschiedenen Chromosomen. Im humanen Genom wurde jedoch eine Häufung funktioneller Einheiten in räumlicher Nähe auf demselben Chromosom beschrieben [234], und die Expression benachbarter Gene wird häufig durch dieselben Transkriptionsfaktoren reguliert [235]. In *C. albicans* teilen die Gene *ZRT1* und *PRA1* die gleiche Promotorregion, wodurch sie durch Csr1 coreguliert werden können [225]. Ob ähnliche Mechanismen bei *ZCF28* und *orf19.4768* existieren, bleibt noch zu untersuchen.

Zu den gemeinsamen Merkmalen beider Deletionsmutanten gehörten eine leicht verminderte osmotische Stresstoleranz und eine deutlich erhöhte Resistenz gegen das Antimykotikum Fluconazol. Azole, wie Fluconazol, inhibieren die Cytochrom P 450 14 α -Lanosteroldemethylase (Erg11 in *C. albicans*), wodurch die Biosynthese und letztlich der Ergosterolgehalt der Zellmembranen reduziert sind. Zudem hemmt die Anhäufung toxischer Intermediate das Zellwachstum [199]. Die Sterolkonzentration beeinflusst die Fluidität und Permeabilität biologischer Membranen und durch Veränderungen in der Membranzusammensetzung können sie dem osmostressinduzierten Absinken des Zellurgors entgegenwirken [236]. In Hefen wird als Antwort auf erhöhte Salzkonzentrationen der HOG-Signalweg eingeleitet, welcher die intrazelluläre Einlagerung von Glycerin induziert [237] und die Expression der *ERG2*- und *ERG11*- Ergosterolbiosynthesegene einschränkt [238]. Ein analoger Mechanismus könnte bei den *C. albicans* *zcf28Δ/Δ*- und *orf19.4768Δ/Δ*-Mutanten vorliegen. Sollten diese Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt die Sterolsynthese aktivieren, würde sich die Verringerung der Erg-Proteine in den Deletionsstämmen positiv auf die Fluconazolresistenz auswirken und auch die Resistenz gegenüber Osmostressoren beeinflussen.

Zwischen den Arten zeigte der *C. dubliniensis*-Wildtypstamm eine höhere Sensitivität gegenüber der Azol-Behandlung. Die meisten klinischen *C. dubliniensis*-Isolate sind Fluconazol-sensitiv und die minimale Hemmkonzentration liegt zwischen 0,125–4 $\mu\text{g/ml}$ [239]. Die Fluconazolresistenz des

C. dubliniensis-Referenzstamms Wü284 war hier mit einer MIC bis zu 8 µg/ml in flüssigem Vollmedium vergleichsweise größer. Patientenisolate, wie der *C. dubliniensis*-Stamm Wü284 [179], können im Rahmen von Azoltherapien mikroevolutionäre Anpassungen durchlaufen und die Azolresistenz von *C. dubliniensis* stabil erhöhen [131]. Die *ZCF28*-Expression in der *C. dubliniensis* Cd*ZCF28*^{OE}-Mutante verhinderte das Wachstum in Fluconazol-haltigem Medium vollständig. Entsprechend der Hypothese erhöht Zcf28 also hier die Aktivität von Genen der Ergosterolbiosynthese, und der erhöhte Gehalt an Sterolen sowie Ergosterolvorläufern führt zu größerer Sensitivität bei Azolzugabe. Zcf28 ist zwar spezifisch für *C. albicans*, aber PBLAST-Analysen mit *S. cerevisiae* ergaben eine partielle Ähnlichkeit (identisch: 35%, positiv: 48,5%) mit dem Zn₂Cys₆-Transkriptionsfaktor Ecm22. Zusammen mit dem paralogen Transkriptionsfaktor Upc2 reguliert Ecm22 die Ergosterolbildung in *S. cerevisiae*, im Besonderen unter Sterolmangel, indem sie spezifische Promotorelemente der *ERG*-Gene binden [240]. Weiterführende Transkriptom-Analysen der *ZCF28*-Mutanten könnten einen Einblick geben, ob ähnliche Regulationsmechanismen auch bei *C. albicans* auftreten.

Des Weiteren war das Wachstum der beiden *C. albicans*-Deletionsmutanten auch unter Nährstoffmangel, wie beispielsweise Zinkrestriktion, partiell eingeschränkt. Sowohl Zcf28 als auch orf19.4768 besitzen beide eine zinkbindende Zn₂Cys₆-Domäne, die charakteristisch für Pilze ist und Analoge zu Csr1/Zap1 können zinkbindende Domänen als Sensoren der intrazellulären Zinkkonzentration dienen [241]. Eine Rolle als Zinksensor könnte den Wachstumsdefekt der *zcf28Δ/Δ*- und *orf19.4768Δ/Δ*-Mutanten begründen, indem wichtige Zinkmangelsignalwege nicht aktiviert werden und beispielsweise eine Mobilisierung intrazellulärer Zinkreserven entfällt.

Ein weiterer nährstoffgekoppelter Phänotyp beider *C. albicans*-Knockout-Mutanten war die erhöhte Sensitivität bei Zugabe der TOR-Inhibitoren Rapamycin oder Koffein. Die nährstoffsensitive Serin-Threonin-Proteinkinase Tor1 ist in Eukaryoten konserviert und kontrolliert das Zellwachstum sowie Alterungsprozesse [201]. Eine spezifische Inhibierung durch das fungizide und zugleich immunsuppressive Makrolid Rapamycin erfolgt durch Interaktion mit dem Immunophilin FKBP-12 und dieser Komplex ist der spezifische Inhibitor der FRB-Domäne von (m)TOR [242]. Koffein ist ein Purinanalogon und inhibiert direkt die Tor1-Kinase, wodurch die zellulären Antworten auf Koffein und Rapamycin in großen Teilen überlappen [200]. In Hefen wird die Tor1-Aktivität durch diverse zellstressauslösende Substanzen induziert, darunter auch oxidativer und Salzstress [201]. Hier könnte eine funktionelle Verknüpfung der Gene *ZCF28* und *orf19.4768* bestehen, die zum Teil Resistenzen gegen NaCl, LiCl und zusätzlich Rapamycin vermitteln.

Die *C. albicans* *zcf28Δ/Δ*- und *orf19.4768Δ/Δ*-Deletionsmutanten zeigten eine wildtypische Hyphen- und Chlamydosporenbildung, sodass diese Faktoren für die Regulation von Morphogenese Prozessen nicht essentiell sind. Die *C. dubliniensis* Cd*ZCF28*^{OE}-Expressionsmutante zeigte dagegen auf Spider-Agar mit zusätzlichen Hypheninduktoren eine leichte radiale Hyphenbildung, was auf eine Rolle in der Filamentierung hindeutet. Dass Zcf28 trotzdem nicht für die Filamentierung von *C. albicans* nötig war, könnte mit dem übrigen Netzwerk von Filamentierungsregulatoren, die den Zcf28-Defekt ausgleichen können, erklärt werden. Eine Redundanz von *C. albicans*-Genen wurde bereits unter

anderem in Hinblick auf die Hyphenentwicklung, Adhäsion und die Bildung degradierender Enzyme beschrieben [243].

Im Zusammenspiel mit Csr1 wurde Zcf28 bereits als positiver Regulator der Adhärenz an Silikonoberflächen diskutiert [89]. Die Anheftung an Grenzflächen ist der initiale Schritt bei der Besiedlung von Wirtsoberflächen und der Biofilmbildung. Die Entstehung von Biofilmen an invasiven medizinischen Geräten ist mit einem enormen Infektionsrisiko und hohen Mortalitätsraten von Patienten verbunden [244]. Die Dichte und Komposition von *C. dubliniensis*-Biofilmen ist artspezifisch und besteht aus einem Geflecht an Hefen und Pseudohyphen, dem jedoch im Gegensatz zu *C. albicans* echte Hyphen fehlen [245].

In einer Transposon-Deletionsmutantenbank wies die *zcf28Δ/Δ*-Mutante keinen biofilmassoziierten Phänotyp auf [246], was im Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen der Abschlussarbeit von C. Pöllath [147] steht, bei der in Biofilmmasse und metabolischer Zellaktivität kein veränderter Phänotyp der *ZCF28*-Deletionsmutante von *C. albicans* bzw. bei *ZCF28*-Expression in *C. dubliniensis* gezeigt werden konnte. Damit bestätigte sich die enge Verknüpfung von Biofilmen von *C. albicans* zur Hyphenentwicklung [88, 247]. Zcf28 nimmt bei der Biofilmbildung eine fein differenzierte Rolle ein: Finkel *et al.* beschreiben zwar keine Einschränkungen der *in vitro*-Biofilmbildung einer *zcf28Δ/Δ*-Mutante, jedoch war Zcf28 unabdingbar für die Adhärenz an Silikonoberflächen und für *in vivo*-Biofilme eines Kathetermodells [89]. Interessanterweise konnte eine *CSRI*-Überexpression im *zcf28Δ/Δ*-Hintergrund die wildtypische Adhärenz wiederherstellen, was eine Zcf28-abhängige *CSRI*-Expression unter adhärenzrelevanten Bedingungen andeutet [89]. Diese Verknüpfung zum zentralen Zinkhomöostaseregulator bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit für die Wachstumsreduktion von *zcf28Δ/Δ* unter Zinkmangel.

Der zwischenartliche Vergleich der beiden Wildtypstämme zeigte eine deutliche Reduktion in der Biomasse von *C. dubliniensis*-Biofilmen [147]. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein stammspezifisches Phänomen, da andere Studien Varianzen zwischen verschiedenen *Candida*-Stämmen beider Arten fanden [207].

In vitro-Tests können stets nur einen Ausschnitt der *in vivo*-Situationen simulieren und beobachtete Phänomene sind nicht zwingend aufeinander übertragbar [248]. Da *C. dubliniensis* ein häufiges Isolat aus dem Mund- und Rachenraum HIV-infizierter Patienten ist [3, 131], wurde für *ex vivo*-Infektionen eine humane, orale Zelllinie gewählt, die zuvor als von *C. albicans* als auch von *C. dubliniensis* kolonisierbar beschrieben wurde [210]. Obwohl während einer Infektion von oralen TR146-Epithelzellen oder des oralen RHEs *C. dubliniensis*-Zellen stets in der Hefeform verbleiben (hier und [144, 210]), zeigten Moyes *et al.* doch eine Aktivierung der primären Transkriptionsfaktoren des angeborenen Immunsystems NF-κB und c-Jun, die Sekretion von IL-6, IL-1α und die Freisetzung von LDH aus TR146-Epithelzellen nach Infektion mit *C. dubliniensis* [210], weshalb dieses Experiment für beide *Candida*-Arten als geeignet erscheint. Eine Gendelektion von *ZCF28*, sowie eine heterologe Überexpression von *ZCF28* zeigten keine Veränderungen in der Zellschädigung. Eine leichte, aber statistisch nicht signifikante Verminderung der Zellschädigung wurde bei der Infektion mit der

orf19.4768Δ/Δ-Deletionsmutante gemessen. Die Funktion von *orf19.4768* während einer oralen *C. albicans*-Infektion ist demnach unklar.

Die Virulenz von unabhängigen *zcf28Δ/Δ*-Deletionsmutanten wurde in getrennten Studien durch *in vitro*-Screeninganalysen und mittels kompetitiven *in vivo*-Poolexperimenten mit weiteren *C. albicans*-Transkriptionsfaktorenmutanten charakterisiert. Im Einklang mit den *in vitro*-Daten der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Änderungen von Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet [96, 97], andererseits war das Überleben eines *ZCF28*-defekten *C. albicans*-Stamms bei Co-Inkubation mit Makrophagen leicht reduziert [166]. Um den Einfluss der *Zcf28* und *orf19.4768*-Transkriptionsfaktoren erstmals separat in einem *in vivo*-Modell zu untersuchen, wurde das embryonierte Hühnerei als Infektionsmodell genutzt [249].

In Übereinstimmung mit anderen Vertebraten-Infektionsmodellen korreliert die Überlebensrate der Embryonen mit der art- oder stammspezifischen Virulenz der Erreger sowie der Infektionsdosis [184, 249]. Im Vergleich zu den *C. albicans*-Stämmen war die Mortalität der Embryonen nach der Infektion mit dem *C. dubliniensis*-Wildtypstamm statistisch signifikant reduziert. Damit stellt das Hühnerei-Infektionsmodell eine gute Alternative zu murinen Modellen für Virulenzstudien von *C. dubliniensis* dar, da in Mausmodellen eine ähnliche Verminderung der Virulenz bei *C. dubliniensis* gezeigt wurde [156, 173]. Dieser Effekt könnte unter anderem auf dem Fehlen eines *ALS3*-Orthologs in *C. dubliniensis* beruhen, denn der *C. dubliniensis* Wildtyp und eine *C. albicans als3Δ/Δ*-Mutante weisen vergleichbare Mortalitätsraten auf [135, 156, 184]. Zur Analyse der *zcf28Δ/Δ* und *orf19.4768Δ/Δ*-Deletionsmutanten wurden mit 10^7 *Candida*-Zellen je Ei sehr hohe Infektionsdosen genutzt und die starke Last an pathogenen Mikroorganismen führte zu einer stamunabhängigen Mortalität von 90-100% innerhalb von sieben Tagen. Jacobsen *et al.* postulierten, dass mittlere bis geringe Virulenzunterschiede unter Verwendung einer niedrigeren Infektionsdosis im Hühnerei-Infektionsmodell deutlicher in Erscheinung treten [184]. Dieses Phänomen wurde bei den Infektionsexperimenten zur Untersuchung der *C. albicans hma1Δ/Δ*-Mutanten bestätigt, welche nur bei niedrig dosierten Inokula von 10^6 Zellen je Ei eine reduzierte Mortalität aufwiesen (siehe Abschnitt 0). Eine niedrigere Infektionsdosis mit niedrigerer Mortalität oder die Infektion am zwölften Entwicklungstag, könnten subtilere Effekte der Gendeletionen *ZCF28* und *orf19.4768* auf die Virulenz hervorrufen.

Da viele Aspekte der Transkriptionsfaktoren *Zcf28* und *orf19.4768* noch offen sind, könnten in zukünftigen weiteren Analysen mit den hier erzeugten Mutanten die Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren über Transkriptomanalysen wie Microarrays oder RNA-Sequenzierungsverfahren ermittelt werden, um ihre biologische Funktion aufzuschlüsseln. Bindungsanalysen an cis-regulativen Elementen von Zielgenen können darüber hinaus über Chromatin-Immunpräzipitations-(ChIP-on-Chip)-Techniken analysiert und die Gruppe der Zielgene definiert werden [250].

7.2 Nährstoff-induzierte Signalwege lösen unterschiedliche zelluläre und morphologische Antworten in *C. albicans* und *C. dubliniensis* aus

Eukaryotische Nährstoffsensoren und die entsprechenden Signaltransduktionswege sind in vielen Aspekten konserviert, vereinzelt kam es aber durch evolutionäre Spezialisierungen zu Veränderungen und Neuerschaltungen einzelner Signalwege. Ähnlich den Mikronährstoffen ist auch die konstante Versorgung der Zelle mit Makronährstoffen, im Besonderen mit Kohlenhydraten und Proteinen, essentiell für Überleben und Wachstum im Wirt. Um spezifische Nährstoffmangel zu tolerieren, haben Mikroorganismen unterschiedliche Strategien entwickelt. Für dimorphe human- und pflanzenpathogene Pilze sind Veränderungen im Nährstoffangebot ein entscheidender Auslöser zum Wechsel der Morphologie und zur Expression virulenzassoziiertes Gene [37, 175, 251].

Ein zentraler Signalweg in Abhängigkeit des Nährstoffangebots ist der konservierte TOR (Targetstruktur von Rapamycin)-Weg, über den in Abhängigkeit von verfügbaren Nährstoffen, insbesondere Stickstoffquellen wie Aminosäuren, aber auch durch Stresssignale die Zellteilung, Proteinbiosynthese und Alterungsprozesse wie die Autophagie reguliert werden [201]. Zudem ist die Aktivität der Tor1-Phosphatidylinositolkinase in Pilzen ein bekannter Regulator der Morphologie [46, 174, 175, 252].

Die extrazelluläre Verfügbarkeit der bevorzugten Kohlenhydratquelle Glucose wird über den Ras-cAMP-Proteinkinase A (PKA)-Signalweg wahrgenommen, dessen Rezeptoren aus zwei G-Proteingekoppelten Systemen bestehen: dem Gpr1-Gpa1-Komplex und einer Hexokinase-vermittelten Aktivierung der Ras1-GTPase. Beide Wege aktivieren die Cyr1-Adenylatzyklase, die die Bildung des Second Messengers cAMP katalysiert [253, 254]. Wie bei TOR gehören zu den Zielproteinen des cAMP-PKA-Wegs unter anderem Faktoren der Hyphenbildung [50]. In vergleichenden Genomanalysen wiesen die cAMP-Signalkomponenten zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* einen hohen Grad der Konservierung auf [143]. Auf Ebene der finalen Effektor-Komponenten finden sich aber speziesspezifische Unterschiede; so induziert Serumzugabe die *EFG1*-Genexpression in *C. albicans*, aber nicht in *C. dubliniensis* [64]. Des Weiteren vermittelt Efg1 in einem Eed1-abhängigen Prozess die Expression von *UME6* in *C. albicans* [255]. Ume6 ist ein Transkriptionsfaktor der Hyphenbildung, welcher in *C. dubliniensis* allein unter Mangelbedingungen exprimiert wird und eine künstliche Expression des *C. albicans UME6*-Transkripts konnte die Hypheninitialisierung in Vollmedium von *C. dubliniensis* positiv beeinflussen [65]. In *C. dubliniensis* wird die *UME6*-Expression hauptsächlich über externe komplexe Stickstoffquellen, wie Pepton und Albumin, und im geringeren Maß durch Glucose gesteuert [65], sodass Ume6 an der Schnittstelle zwischen cAMP- und TOR-abhängigen Signalwegen einzuordnen ist. Während ein strukturell ähnliches Ume6-Ortholog (CD36_05880) in *C. dubliniensis* existiert, weist das nur entfernt ähnliche putative Eed1-Ortholog (CD36_34980) in diesem Pilz eine zusätzliche chromatinmodifizierende Domäne auf [255, 256]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *C. albicans-EED1* in *C. dubliniensis* heterolog exprimiert und morphologisch charakterisiert. Jedoch blieb diese Expressionsmutante unter *C. albicans*-spezifischen Hypheninduktoren weiter afilamentös (Daten nicht gezeigt) – im Gegensatz zu Ume6 tragen die vermuteten Eed1-Orthologe scheinbar nicht signifikant zur artspezifischen Filamentierung bei.

In *C. albicans* steuert der Tor1-Kinase-Weg die Filamentierung und die Expression von Adhäsinen [252]. Eine reduzierte Tor1-Aktivität durch Nährstoffmangel oder Rapamycinzugabe führt zu Histonmodifikationen und zur Verdrängung des Repressors Nrg1 aus den UTR-Bereichen hyphenassoziierter Gene [51, 257]. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die artspezifische Morphologieregulation, die stark von Nrg1 abhängt [62, 66], mit dem TOR-Weg verbunden ist. Bestätigung brachte die Zugabe von Rapamycin zu Pepton-haltigem Medium, welches die Filamentierung von *C. dubliniensis* induzierte, wenn gleich nicht das wildtypische *C. albicans*-Level erreicht wurde [63]. Darauf baut sich eine Hypothese der geringeren intrinsischen Tor1-Aktivität von *C. albicans* unter Bedingungen der Hypheninduktion. In scheinbarer Diskrepanz zu den bisher diskutierten Ergebnissen, die in Flüssigmedien erarbeitet wurden, inhibiert die Zugabe von Rapamycin die Filamentierung und Faltenbildung von *C. albicans*-Kolonien auf Agarplatten [252] und phänokopiert damit *C. dubliniensis*. Daraufhin postulierten Bastidas und Autoren, dass das Erkennen von festen Oberflächen und die Adhärenz an diese möglicherweise eine Rolle bei der TOR-geleiteten Induktion von morphogenetischen Veränderungen spielt. Dies kann von Relevanz für die Chlamydosporenbildung in den folgenden Betrachtungen sein, da diese Sporen auf Agaroberflächen besonders stark induziert werden.

7.2.1 Charakterisierung struktureller und regulativer Komponenten der Chlamydosporulation

C. albicans und *C. dubliniensis* sind die einzigen Chlamydosporenproduzenten der Gattung. Die Chlamydosporenbildung von *C. albicans* wurde bereits vor über 50 Jahren beschrieben und nährstoffarme Medien wurden als Induktor benannt [258]. Mit der Entdeckung von *C. dubliniensis* wurde eine Reihe von Differenzierungsmedien auf lipidreicher Pflanzensamenbasis (Staib-Agar basiert auf Nigersaat und Pal-Agar nutzt Sonnenblume) entwickelt, die eine Unterscheidung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ermöglichen und Anwendung in der klinischen Diagnostik finden [148, 259]. Auffällig ist, dass das Vermögen zur Sporulierung bei *C. dubliniensis* stets größer ist und es ist bisher kein Medium bekannt, welches Chlamydosporen spezifisch bei *C. albicans* induzieren kann. Diese Beobachtung legt konservierte Mechanismen der artspezifischen Chlamydosporenbildung nahe und deren Analyse kann das Verständnis über die Natur dieser Strukturen erweitern.

Über das Auftreten und eine mögliche Beteiligung von Chlamydosporen während muriner und humaner Infektionen herrschen widersprüchliche Informationen. *Ex vivo* konnte gezeigt werden, dass Chlamydosporen von *C. albicans* von Mausmakrophagen phagozytiert werden und dann durch Bildung von Keimschläuchen aus den Immunzellen ausbrechen können [52]. Vereinzelt histologische Befunde zeigen chlamydosporenartige Zellen in infizierten Geweben [260, 261], allerdings ist die Zuordnung hier noch nicht endgültig gesichert.

7.2.1.1 Die Chlamydosporulation geht mit einer Umstrukturierung der Zellwand einher

Die biologische Funktion, die mögliche Bildung *in vivo* und die genetische Regulation sind drei große Unbekannte auf dem Gebiet der Chlamydosporen-Forschung. In den Manuskripten 2 und 3 wurden zwei unterschiedliche Strategien gewählt, um neuartige Faktoren in dieser speziellen Form der

Morphogenese zu charakterisieren. Der gewählte methodische Ansatz in Manuskript 2 (Palige *et al.* [151]) zielte auf das vergleichende Transkriptom von Hefezellen gegen Chlamydosporen und Pseudohyphen, und es wurden Gene identifiziert, die morphotypisch und zugleich in hoher Transkriptmenge exprimiert wurden. Namensgebend für die Chlamydosporen (*chlamys* (lateinisch): Mantel) ist die hervorstechende Verdickung der geschichteten Zellwand. Eine signifikant veränderte Zellwandstruktur und ihre assoziierten Proteine spiegeln sich in den differentiell exprimierten Genen wider. Als chlamydosporenspezifische Komponenten wurden zwei Zellwandproteine (*CSP1* und *CSP2*) mit hoher Abundanz und GPI-verankerte Membranproteine (*PGA13*, *PGA55* und *IHD1*) detektiert [151]. Die Zellwand von Chlamydosporen ist zweilagig mit einer äußeren, dünnen Schicht, die reich an β -1,3-Glucan ist und etwas Chitin enthält [53]. Die Innenschicht ist proteinreich und beherbergt wahrscheinlich die zellwandständigen Csp-Proteine. Die Gendeletion ausgewählter Chlamydosporen-spezifischer Gene in *C. dubliniensis* hatte wenige phänotypische Auswirkungen. Es traten keine Beeinträchtigungen der Sporulation und in der Resistenz aller morphologischen Strukturen gegen Zellwandstressoren auf [147, 151]. Die *CSP*-Gene sind weitestgehend einzigartig für die Chlamydosporenproduzenten *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Das nächste Ortholog in *S. cerevisiae* ist Pir3, ein O-glykosyliertes Zellwandprotein, das zur Zellwandstabilität beiträgt und dessen Knockout-Mutanten eine verminderte Adhäsion an die Oberfläche von enteropathogenen Bakterien zeigten [262]. Da diese zellwand- und zellmembranständigen Proteine der *Candida spp.* in Genfamilien auftreten, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Redundanzeffekt auszugehen, und erst die simultane Deletion mehrerer Gene könnte die Integrität einschränken.

Vor kurzem wurde die Expression von chlamydosporenspezifischen *C. albicans* *CSP*-Genen während der Infektion in Mäusenieren nachgewiesen [260]. Allerdings war das *in vivo* gemessene Transkriptlevel des *CSP1*-Gens gegenüber *in vitro*-Studien [151] äußerst gering. Obwohl diese Werte auf unterschiedlichen experimentellen Voraussetzungen beruhen und nur indirekt vergleichbar sind, legt die enorme Diskrepanz nahe, dass keine wahre oder eine verschwindend geringe Chlamydosporenproduktion *in vivo* zu beobachten war.

Die strenge Inkubationstemperatur von maximal 28 °C [263] und der Nachweis von Chlamydosporennegativen *C. albicans*-Stämmen von Patientenisolaten aus Urin, vaginalen Abstrichen oder Kathetern [264] sind weitere Argumente gegen eine Chlamydosporenbildung während einer systemischen Infektion von Warmblütern.

7.2.1.2 Chlamydosporen- und Hyphenbildung nutzen dieselben zentralen Signaltransduktionswege mit morphologiespezifischen Abwandlungen

Während ein wohlbekanntes vielschichtiges Netzwerk die Hyphenbildung in *C. albicans* kontrolliert, waren zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Regulatoren der Chlamydosporenbildung bekannt. Obwohl bereits im Jahr 1970 Nährstoffmangel als ein Induktor der Sporulation diskutiert wurde [59], wurde das Phänomen nicht detailliert untersucht, und die fehlende Trocken- und Hungerresistenz widerlegte die Hypothese, dass es sich um Überdauerungsstrukturen handeln könnte [52]. Die wenigen bis dato bekannten regulatorischen Faktoren der Chlamydosporulation entstammten unterschiedlichen Signalwegen und sind allenfalls lose miteinander verbunden, beispielsweise über den

Transkriptionsfaktor Efg1, den MAP-Kinase-HOG-Weg und den pH-abhängigen Rim101-Weg [55, 61, 121]. Die Transkriptomanalysen dieser Arbeit zur Chlamydosporulation konzentrierten sich auf Gene mit hoher mRNA-Abundanz. Dadurch sind regulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktoren zum einen durch ihre allgemein geringen Transkriptmengen unterrepräsentiert [265], und zum anderen dadurch, dass ihre intrazelluläre Konzentration präziser Selbst- und Fremdkontrolle unterliegt. So erreicht beispielsweise das Transkriptlevel von *C. albicans EFG1* einen Peak während der Hypheninitiation, der durch negative Autoregulation rasch abflacht [266]. Der Fokus eines zweiten methodischen Ansatzes galt den putativ essentiellen Elementen der Sporulationsregulation. Alle bisher untersuchten *C. albicans*-Deletionsmutanten mit totalem Chlamydosporulendefekt zeigten auch einen Verlust oder eine Einschränkung der Filamentbildung. Zusätzlich korreliert interessanterweise die atypische Chlamydosporulation nach Deletion etlicher *C. albicans*-Gene (*BMH1*, *EFG1*, *HOG1*, *MDS3*, *NRG1*, *RIM101*, *SCH9* und *VPS11*) mit einer veränderten Rapamycin-Resistenz, was auf eine Verbindung dieser Faktoren mit dem TOR-Signalweg hindeutet [55, 61, 62, 121, 228, 252, 267, 268]. Diese mögliche Verbindung wurde im Manuskript 3 eingehend untersucht und mit Hilfe eines zusätzlichen systematischen Screenings bekannter Regulatoren der Hyphenbildung wurden sowohl der TOR- als auch der cAMP-PKA-Weg als essentielle Komponenten der Sporulation beschrieben.

Dabei werden die Signalkaskaden in Abhängigkeit der verfügbaren Nährstoffe gesteuert [155]. Der Entzug präferierter Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen wie Glucose und Ammonium wurde bereits als ein Induktor der sexuellen Sporulation und Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* beschrieben [269]. Auch die Bildung der asexuellen Chlamydosporen gilt als eine Form der Glucosemangel induzierten Antwort in *C. albicans* [59]. In Manuskript 3 konnte erstmals gezeigt werden, dass neben Glucose auch die Konzentrationen anderer Mono- und Disaccharide sowie Zugabe von Pepton inhibierend auf die Chlamydosporulation wirken.

Hungerantworten im Zuge eines Stickstoffmangels lösen TOR-abhängigen Mechanismen aus, die sich in den NCR- (Repression des Stickstoffkatabolismus) und den GAAC-Weg (Regulation der Aminosäurebiosynthese) gabeln. Diese Regulationskaskaden sind in Hefen konserviert [201, 253] und wirken positiv auf die Hyphenelongation von *C. albicans* [174]. Störungen innerhalb dieses Signalweges, wie durch die Gendelektionen eigener und vorheriger Studien, aber auch die hier beschriebene Rapamycin- oder eine erhöhte Peptonzugabe, verhinderten die Sporulation [61, 155]. Neben der nährstoffabhängigen Signalweiterleitung über den TOR-Weg wird während der Hypheninitiation durch Glucose, der induzierenden Komponente von Serum, auch der Ras-cAMP-PKA-Weg aktiviert [45]. Die Aktivitäten beider Signalwege sind ebenso essentiell für eine Sporulation in *C. albicans*, da die Deletionen zentraler Elemente (TOR-Weg: *GATI*, *GCN4*, *MDS3*, *SCH9* und cAMP-PKA-Weg: *RASI*, *CYR1*, *EFG1*) zu Morphogenesedefekten führten [55, 61, 121, 155, 175]. Ähnlich wie bei der erhöhten TOR-Aktivität durch Peptonzugabe führte Glucose oder extrazelluläres cAMP zu einer Unterdrückung der Chlamydosporulation [155]. Es scheint also, dass die Sporulation ein über mehrere parallele Wege kontrollierter Prozess ist, und nur gleichzeitig niedrige Basalaktivitäten des TOR- und cAMP-PKA-Weges eine Induktion ermöglichen.

Die Chlamydosporulation von *C. albicans* reagiert deutlich sensitiver auf Nährstoffsupplementation als die von *C. dubliniensis*, doch bringt eine *NRG1*-Deletion den Effekt auf das Niveau des *C. dubliniensis*-Wildtyps. Es scheint also, dass die Grundlage der speziesspezifischen Chlamydosporulation in den unterschiedlichen Schwellenwerten für die Hungerantwort zu finden ist und dass Nrg1 in *C. albicans* der wichtigste Repressor ist. Die Derepression in einer *C. albicans nrg1Δ/Δ*-Deletionsmutante wurde bereits auf Staib-Agar gezeigt [62], doch konnte hier nachgewiesen werden, dass dieser Effekt medienunabhängig auch auf SLAD- und Casein-Agar auftritt [147, 155]. Nrg1 hat evolutionär zwar seine Funktion eines morphologischen Repressor behalten, doch variiert der Schwellenwert der Induktion auch in Hinblick auf die Filamentierung. In *C. dubliniensis* inhibiert Nrg1 die Bildung echter Hyphen unter nährstoffreichen Bedingungen, wie YPD oder DMEM, unter denen *C. albicans* filamentiert, doch eine *C. dubliniensis nrg1Δ/Δ*-Deletionsmutante bildete Keimschläuche [66]. Hyphen- und Chlamydosporenbildung scheinen dabei gegenläufige Prozesse zu sein. Die artspezifischen Verknüpfungen des Regulators Nrg1 sind somit zentraler Baustein zweier morphologie- und putativ virulenzassoziierter Phänotypen.

Andere Faktoren der *C. albicans*-spezifischen Filamentierung spielen eine eher untergeordnete Rolle für die Chlamydosporulation: Obwohl die heterologe Expression des Nrg1-Targets *CaUME6* in *C. dubliniensis* eine Filamentierung in Pepton-haltigem Medium erlaubt und eine Deletion in *C. albicans* diese unterdrückt [65, 270], hatten weder *UME6*-Deletion noch -Überexpression Einfluss auf die Sporenbildung von *C. albicans* [155]. Ein weiteres Beispiel für eine ungekoppelte Verschaltung der Chlamydosporenbildung gegenüber der Filamentierung ist die Phosphodiesterase *Pde2*: ein Faktor, der essentiell für die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration ist [271]. Auch unter nicht-induzierenden Bedingungen ist die *C. albicans pde2Δ/Δ*-Knockout-Mutante hyperfilamentös [271], jedoch war keine Bildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen auf nährstoffreichem Medium möglich. Damit kann das erhöhte cAMP-Level einer Phosphodiesterase-negativen *C. albicans*-Mutante die inhibitorischen Effekte von Pepton und Glucose nicht aufheben [155].

7.2.2 Stickstoffknappheit als Auslöser morphologischer Wechsel

Stickstoffmangel ist ein bedeutsamer morphologischer Induktor der Filamentierung und des invasiven Wachstums, dessen Effekte in unterschiedlichen Hefespezies, von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. lusitaniae* bis zu diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen, konserviert sind [46, 47]. SLAD-Medium gilt bei 37 °C als klassische Bedingung zur Ausbildung echter Hyphen in *C. albicans* [48], und in dieser Arbeit konnte es bei niedriger Temperatur als neuartiges synthetisches, *C. dubliniensis*-spezifisches Chlamydosporenmilieu etabliert werden [155, 212]. Die Entwicklungen dieser Morphologien sind weitestgehend als Artspezifika zu werten, da sie charakteristisch in acht von neun *C. albicans*- und in allen elf getesteten *C. dubliniensis*-Patientenisolaten [179] zu beobachten waren (**Fehler! erweisquelle konnte nicht gefunden werden.** im Anhang). Damit liegt die Nachweisgenauigkeit ähnlich hoch wie bei vergleichbaren Selektivmedien [148, 203, 272], jedoch sollte die Anzahl klinischer *Candida*-Isolate erweitert werden, um die Reliabilität einer stammunabhängigen Differenzierung zu bewerten.

Wegen der auffälligen phänotypischen Unterschiede wurde SLAD-Agar als Selektionsmedium gewählt, um eine integrative genomische *C. dubliniensis*-Bibliothek in *C. albicans* auf Filamentierung und/oder Chlamydosporenbildung zu testen. Das Screening von etwa 20.000 Genbanktransformanten ergab keine Chlamydosporen-positiven Kolonien, jedoch wurden erfolgreich hyperfilamentöse Klone, wie der Stamm Ca10050INT, isoliert. Da eine Filamentierung von *C. albicans*, wenn auch exklusiv unter erhöhten Temperaturen, auf SLAD-Agar induziert werden kann, ist es möglicherweise biologisch leichter Hyphen zu bilden als die Chlamydosporenrepression zu überwinden.

7.2.3 Die Expression der Mnn2-Mannosyltransferase ist verknüpft mit der Filamentierung von *Candida*-Arten selbst unter repressiven Bedingungen

Genomische heterologe *Candida*-Bibliotheken wurden bereits für die Identifikation von *C. albicans*-Genen etabliert und der Chlamydosporenrepressors Nrg1 und der tRNA-Modifizierer Hma1 wurden als Morphologiedeterminanten entdeckt [62, 212]. Ziel dieses Screeningverfahrens war die Identifizierung genetischer Elemente von *C. dubliniensis*, die zu phänotypischen Veränderungen in *C. albicans* führen können. Sequenzanalysen zeigten, dass die heterologe Integration des *C. dubliniensis*-Gens CdMNN2 (CD36_10050), dem Ortholog der *C. albicans* α -1,2-Mannosyltransferase Mnn2, ursächlich für die gesteigerte Filamentierung des *C. albicans*-Stammes Ca10050INT war. Eine erhöhte Filamentierung von *C. albicans* unter nicht-induktiven Bedingungen durch Integration eines *C. dubliniensis*-DNA-Fragments ist daher bemerkenswert, da *C. dubliniensis* gewöhnlich nur unter strikt definierten Bedingungen echte Hyphen bildet [64-66, 143, 146]. Neben der direkten Wirkung speziessfremder Regulatoren kann schon die alleinige Erhöhung der Kopienzahl durch die Genintegration veränderte Phänotypen hervorrufen. Die orthologen Mnn2-Proteine der untersuchten *Candida*-Arten unterscheiden sich nur gering (PBLAST: 91,3% identisch, 95,8% positiv), so dass auch eine hohe funktionelle Übereinstimmung naheliegt und somit funktional die MNN2-Allelanzahl erhöht worden sein könnte. Ein Verlust der Genkopienanzahl, wie bei der Haploinsuffizienz, ruft bei *C. albicans* bereits schwerwiegende Auswirkungen auf morphologische Transitionen aus [273]. Im Fall von Ca10050INT scheint die erhöhte Kopienzahl zusammen mit einem zweiten Effekt zu wirken: Die Integration einer dritten CaMNN2-Genkopie erhöhte die Filamentierungsrate von *C. albicans* sowohl auf SLAD-Minimalmedium als auch auf YPD. Allerdings führte diese Integration eines dritten Allels vorrangig zur Entstehung von Pseudohyphen, während die Ca10050INT -Transformante zusätzlich echte Hyphen und eine weiter erhöhte Faltenbildung der Kolonien zeigte. Das *C. dubliniensis*-Gen hatte also einen stärkeren Effekt als das native Ortholog.

Die Zellwand von *C. albicans* besteht vorrangig aus vernetzten Kohlenhydratpolymeren (Chitin, Glucan, Mannan) und Proteinen, wobei sich der Zellwandaufbau zwischen Hefen- und Hyphenzellen unterscheidet [274, 275]. Mnn2 ist eines von sechs Mitgliedern der MNN2-Genfamilie, die eine α -1,2-Mannosylierung von bereits bestehenden Mannosylketten, die ihrerseits an Proteine der äußeren pilzlichen Zellwand geknüpft sind, vermitteln [213, 214]. Mannane und die posttranslational modifizierten Mannoproteine sind bedeutende Moleküle, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), die im Zuge der angeborenen Immunantwort durch C-Typ-Lektinrezeptoren von Makrophagen erkannt werden [276]. Als virulenzassoziierte Faktoren wurden Mannosyltransferasen in

C. albicans bereits gut untersucht: Mnn2 ist ein hyphenassoziierter Faktor [277], dessen Verlust zu einer reduzierten Filamentierung und verminderter Virulenz in einer intravenösen Mausinfektionsmodell führt [213]. Bereits der Verlust eines *MNN2*-Allels führte zu einer gendosisabhängigen Reduktion der Hyphenbildung auf Spider-Agar [278], was die Annahme bestärkt, dass die verstärkte Filamentierung von *Ca10050INT* in großen Teilen auf der Insertion einer dritten *MNN2*-Genkopie beruht.

In *S. cerevisiae* führt ein Mnn2-Defekt einer Veränderung der Morphologie mit abgerundeten statt länglichen Hefezellen [279]. In Übereinstimmung dazu wiesen die *C. albicans*-Expressionsmutanten Unregelmäßigkeiten in der Hyphenbildung und Deformationen einzelner Filamente auf, möglicherweise verursacht durch Störungen in der bipolaren Zellteilung und des Längenwachstums. Eine Reduktion des Mannosylierungsgrads geht mit einer Verringerung der Zellwandintegrität einher, die teilweise durch einen verstärkten Einbau von Glucan ausgeglichen wird, was wiederum zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber zellwandgerichteten Antibiotika führt [214]. In *C. albicans*-Deletionsmutanten von Nrg1 und Tup1 wurde eine deutliche Zunahme der *MNN2*-Transkriptmenge gemessen [277]. Im Zusammenhang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen auf SLAD-Agar ist festzustellen, dass Nrg1 die Hyphenbildung und Chlamydosporulation von *C. albicans* auf SLAD-Agar unterdrückt [155] und im *Ca10050INT*-Stamm eine künstliche Expression des Nrg1-Targetgens *MNN2* die transkriptionelle Inhibierung des Morphologiewechsels überwinden kann.

Die Versuche zur *MNN2*-Expression zeigten, dass eine Veränderung der Zellwandkomposition auch die nährstoffinduzierte Morphogenese von *C. albicans* beeinflusst. Eine Rolle der verfügbaren Nährstoffe auf Integrität und Zusammensetzung der pilzlichen Zellwand ist bereits bekannt. So führen physiologische Laktatkonzentrationen im Medium im Gegensatz zu Glucose zur Maskierung zellwandassoziierter PAMPs, und der Verlust des Transkriptionsfaktors Ace2, dem zentralen Regulator der Mannosylierungsgene, oder des α -1,3-Mannosyltransferasegens *MNN14* führen zur Exposition von Glucan an der Zelloberfläche [280].

7.3 tRNA-modifizierende Enzyme als neuartige Virulenzdeterminanten in Hefen

7.3.1 Codons, Anticodons und deren Bindungsaffinität

Der zentrale Mechanismus der Translation ist die Paarung von Codon- und Anticodontriplets und die anschließende Verlängerung der Polypeptidkette. Die beiden bedeutsamsten Parameter für die Effizienz dieses Vorgangs sind die Abundanz von tRNA-Spezies und damit verbunden das *Codon Usage*, also die Bevorzugung einzelner Codonspezies gegenüber anderen identisch kodierenden im degenerierten genetischen Code. Hierbei sind tRNAs keine passiven Moleküle, vielmehr greifen sie aktiv in den Translationsprozess ein. Codon-Anticodon-Bindungsaffinitäten werden über das Triplet hinaus bestimmt, indem durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen verschiedenartiger RNA-Moleküle und durch das Einführen chemischer funktioneller Gruppen die Spezifität der Codonerkenkung, die Bindungsstabilität sowie die Effizienz und Translationsgeschwindigkeit moduliert werden [109, 281].

Während der Codon-Bias genetisch determiniert ist, sind posttranskriptionelle Modifikationen der tRNA durch ihren epigenetischen Charakter dynamisch und ermöglichen, die Genauigkeit und Effizienz der Codon-Anticodon-Paarungen in Abhängigkeit der Umweltbedingungen anzupassen [282].

Die Bedeutungen zweier modifizierender Enzyme (Hma1 und Ncs2), die unterschiedliche tRNA-Basenmodifikationen innerhalb und in Nachbarschaft des Anticodons katalysieren, wurden in Manuskript 4 und in einer bisher unveröffentlichten Arbeit in Kooperation mit der Forschungsgruppe Leidel (RNA-Biologie, MPI Münster) auf ihre Rolle für die Pathogenese von *Candida*-Arten untersucht. Hinweise auf eine wichtige Funktion dieser tRNA-modifizierenden Enzyme kamen auf zwei sehr unterschiedlichen Wegen. Die Expression bzw. Deletion von Hma1 beeinflusste die artspezifische Morphologie von *C. albicans* und somit auch virulenzassoziierte Mechanismen. Gleichzeitig fiel ein klinisches *S. cerevisiae*-Isolat durch eine Punktmutation im *NCS2*-Gen auf, durch die der Stamm hypervirulent wurde [215]. Weiterführend sollte hier die Funktion von Ncs2 in *C. albicans* charakterisiert werden, um die Rolle von tRNA-Modifikationen in der Virulenz einer humanpathogenen Hefe zu bestimmen.

Insbesondere ist *C. albicans* dabei auch von Interesse, da bei dieser und verwandten Hefen eine Besonderheit im genetischen Code existiert. Viele *Candida*-Arten, inklusive *C. albicans* und *C. dubliniensis*, decodieren das Leucin-Codon CUG präferentiell, aber nicht ausschließlich, als Serin. Diese Entwicklung ist auf ein singuläres genetisches Ereignis zurückzuführen, das etwa 272 Millionen Jahre zurückliegt und so die sogenannte CUG-Klade begründete [283]. Die zweideutige Translation dieses Codons erhöht die genomische Anpassungsfähigkeit, und es wird angenommen, dass der Erwerb des alternativen genetischen Codes sowohl Evolutionsprozesse beschleunigte als auch die phänotypische Diversität der Mitglieder der CUG-Klade erweiterte [284]. Experimentelles Einbringen von Leucin-tRNAs mit üblichen CAG-Anticodons hatte weitreichende zelluläre Auswirkungen in *C. albicans*, wie Veränderungen in der Zelladhärenz, der Koloniemorphologie und der Sekretion hydrolytischer Enzyme zur Folge [284]. Zudem erhöhte die Expression der CUG-Klade-typischen tRNA-Spezies in *S. cerevisiae* dessen Thermotoleranz, was den Selektionsdruck in humanpathogenen *Candida*-Arten darstellen könnte [285]. Somit besteht hier schon ein – wenn auch anders gelagerter – Fall einer Verbindung von tRNA-Nutzung und -Ablesegenauigkeit zu Virulenzattributen von *C. albicans*.

7.3.2 Die Hma1 und Ncs2-Enzymkomplexe katalysieren entscheidende Modifikationen der tRNA-Anticodonschleife

Die untersuchten modifizierenden Enzyme sind verantwortlich für tRNA-Basenmodifikationen innerhalb und in direkter Nachbarschaft der ASL. Die Basen der Position 34 (Wobblebase) und Purinbasen an Position 37 treten häufig stark modifiziert auf, und Ncs2 bzw. Hma1 sind beispielhafte Modifizierer beider Schlüsselpositionen.

Durch Modifikationen der Uridinbasen an der Wobbleposition werden jene charakteristisch nicht-kognaten Bindungen ermöglicht: Die chemische Veränderung von Uridin₃₄ zu 5-Methoxycarbonylmethyl-2-Thiouridin (mcm⁵s²U₃₄) verstärkt die Codon-Anticodon-Paarung

zwischen A-U-, aber auch G-U-Paaren [282]. Bei defekten U₃₄-Modifikationen akkumulieren Zellen Proteinaggregate, und Schlüsselgene der proteotoxischen Stressantwort werden verstärkt exprimiert [286]. Die Biosynthese verläuft in drei nacheinander geschalteten Schritten [114, 287]: Die beiden Reaktionen zu 5-Methoxycarbonylmethyl (mcm⁵) werden durch den ELP (Elongator-Protein)-Komplex, der sich aus sechs Untereinheiten zusammensetzt, und zweier tRNA-Methyltransferasen vermittelt (Einzelheiten der Modifizierungsreaktionen sind Tabelle 10 zu entnehmen). In drei tRNA-Spezies (tRNA^{-Glu}_{UUC}, tRNA^{-Lys}_{UUU}, tRNA^{-Gln}_{UUG}) wird die Modifikation durch das Einfügen der 2-Thiolgruppe durch den heterodimeren Enzymkomplex Ncs2-Ncs6 erweitert [288, 289]. Die Abwesenheit von thiolierten tRNAs in *nsc2Δ*-Mutanten wurde entsprechend zuvor in *S. cerevisiae* analysiert [290] - dabei ist Cystein die primäre Schwefelquelle, und da der Großteil des intrazellulären Schwefels in Form von tRNA-Modifikationen gebunden ist, dienen ihre Konzentrationen zugleich als Indikatoren der zellulären Schwefelverfügbarkeit [115].

Tabelle 10 Enzymatische Schritte der Uridin₃₄-tRNA-Modifikationen. Über eine dreistufige Reaktion entsteht ein komplex modifiziertes Uridinderivat. Die einzelnen Reaktionsschritte wurden entsprechend Chen *et al.* [287] zusammengefasst.

Edukte	Enzyme	Produkte	Art der Reaktion	Präkursor der funktionellen Gruppe
tRNA (Uridin U ₃₄), Acetyl-CoA	ELP-Komplex	cm ⁵ U ₃₄ (5-Carbonylmethyl-Uridin)	Carboxy-methylierung	Acetyl-CoA (nicht vollständig aufgeklärt)
cm ⁵ U ₃₄	tRNA-Methyltransferasen	mcm ⁵ U ₃₄ (5-Methoxycarbonylmethyl-Uridin)	Methylveresterung	S-Adenosylmethionin
mcm ⁵ U ₃₄ , ATP	Urmylierungsenzyme (Uba4, Urm1) und Ncs2-Ncs6	mcm ⁵ s ² U ₃₄ (5-Methoxycarbonylmethyl-2-Thiouridin)	Thiolierung	Cystein

Evolutionär tragen bereits die bakteriellen Vorläuferproteine des Modifikationsapparats konservierte funktionelle Domänen der Schwefelübertragung und dienen dort der Thiolierung von Eisen-Schwefel-Clustern, Vitaminen und Cofaktoren [291]. In Eukaryoten wurden die neuen Schwefelakzeptoren tRNAs. Während das thiocarboxylierte Urm1-Protein den Präkursorkomplex für tRNA-Modifikationen (und zudem für Urmylierungen, ähnlich der Ubiquitinierung [292]) darstellt, ist der Ncs2-Ncs6-Heterokomplex ausschließlich an der Thiolierung der tRNA-Uridinbasen beteiligt [114, 290]. Durch die Untersuchung einer *C. albicans nsc2Δ/Δ*-Deletionsmutante können deshalb

phänotypische Effekte spezifisch der mangelnden tRNA-Modifizierung, ohne Einfluss von Urmethylierungseffekten, zugeschrieben werden.

Hma1 in *C. albicans* verwendet als Substrat ein an der Position 37 (5'-seitig der ASL) prämodifiziertes Nukleotid [293]. Dabei handelt es sich um Threonylcarbamoyladenosen (t^6A), eine der wenigen konservierten tRNA-Modifikationen, die strukturell die Auflage von mRNA-Strängen am Ribosom stabilisiert, indem die tRNA-Schleife eine planare Ebene einnimmt und intramolekulare U_{33} - A_{37} -tRNA-Paarungen sowie Leserahmenverschiebungen verhindert werden [116, 294]. Ähnlich der Uridinmodifikation wird auch der Adeninrest in einem mehrstufigen Prozess modifiziert (Übersicht in). Es bedarf der energetischen Aktivierung der Substrate Bicarbonat und Threonin, und das Zwischenprodukt wird durch den KEOPS-Komplex auf ein unmodifiziertes Adenosin von tRNA-Molekülen, die einzig ANN-Codons binden, übertragen [116, 293].

Tabelle 11 Enzymatische Schritte der Adenin₃₇-tRNA-Modifikationen. Sua5 aktiviert die Substrate Bicarbonat und Threonin unter ATP-Verbrauch und der KEOPS-Enzymkomplex katalysiert die t^6A -Bildung. In Hefen findet eine t^6A -Veresterung zu ct^6A durch Tcd1/2 bzw. Hma1 statt. (Zusammengefasst nach [5, 293, 295])

Edukte	Enzyme	Produkte	Art der Reaktion
Bicarbonat, Threonin, ATP	Sua5	Carbamoylthreonin	Kondensation, ATP-Hydrolyse
Carbamoylthreonin, tRNA (A_{37}), ATP	KEOPS-Komplex	t^6A (N^6 -Threonylcarbamoyladenosen)	Kondensation, ATP-Hydrolyse
t^6A	Tcd1/2 in <i>S. cerevisiae</i> ; Hma1 in <i>C. albicans</i>	ct^6A (zyklisches Threonylcarbamoyladenosen)	Zyklische Esterbildung

Die Bäckerhefe vermittelt den Schluss der zyklischen Esterbindung (ct^6A) durch die Dehydratasen Tcd1 und Tcd2 [5]. In Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Protisten stellt ct^6A die native Form der Adenosinmodifikation dar [5], doch ist beispielsweise kein humanes Ortholog zum pilzlichen Dehydrataseprotein bekannt (<http://www.candidagenome.org>, Stand Februar 2017). Die chemische Struktur der Modifikationen erscheint noch divers, denn neue Untersuchungen zeigten, dass entgegen der ursprünglichen Annahme der zyklische Schluss nicht über einen Oxazolone-Ring, sondern durch eine Hydantoin-Gruppe erfolgt [296]. Sie beeinflusst die nicht-kovalenten Wechselwirkungen und es wurde ein negativer Effekt auf das strukturelle Abflachen der ASL postuliert [117]. Zudem wurde in Pflanzen und Bakterien kürzlich eine weiterführende Methylierung zu 2-Methylthio-zyklischem t^6A (ms^2ct^6A) beschrieben [297].

Die Identität der Aminosäuresequenzen von Tcd2 mit den homologen Hma1 in beiden untersuchten *Candida*-Arten ist moderat hoch [212], und da auch die funktionell wichtige ThiF-ähnliche Proteindomäne evolutionär konserviert ist, scheint auch die Enzymfunktion erhalten zu sein: So wurde in einer ersten Messung der *C. albicans hma1Δ/Δ*-Deletionsmutante die zyklische t^6A -Variante bis zu

1000-fach weniger häufig detektiert (siehe Abbildung 18 im Anhang, unveröffentlichte Daten von Sebastian Leidel, MPI Münster). Da die ct^6A -Verbindung in Spuren auch im Hma1-negativen Stamm gemessen werden konnte, kann die Funktion möglicherweise, wenngleich in stark reduzierter Effizienz, durch eine weitere Dehydratase übernommen werden. Vergleichbares wurde bereits in *S. cerevisiae* beobachtet, wobei geringe Mengen der modifizierten tRNAs auch in einzelnen Mutanten des KEOPS-Komplexes nachgewiesen worden [298]. Hma1 der untersuchten *Candida*-Arten trägt, wie in *S. cerevisiae*, eine ThiF/E1-Ubiquitinaktivator-Proteindomäne und damit gleicht es dem Uba4-Enzym der Urmyleierungsreaktion und tRNA-U₃₄-Thiolierung (PFAM 30.0-Analyse [299]), was eine genetische und funktionelle Verwandtschaft der Enzyme nahelegt. Inwiefern Hma1 tatsächlich an Proteinurmylierungen beteiligt ist, bleibt zu untersuchen.

Im *C. dubliniensis*-Wildtyp wurde, im Gegensatz zu *C. albicans*, die hydrolysierte t^6A -Form unter den Wachstumstemperaturen von 30 °C als auch 37 °C häufiger gemessen (siehe Abbildung 18 im Anhang). Spezifika in tRNA-Modifikationsmustern unterscheiden sich oft phylogenetisch [300, 301], und diese Unterschiede in den ct^6A -Leveln könnten zu den bekannten Artunterschieden in *Candida* beitragen.

7.3.3 tRNA-Modifikationen beeinflussen artspezifische morphologische Transitionen

Seit sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* vor 20 Millionen Jahren von ihrem gemeinsamen Vorfahren abgespalten haben [160], entwickelten sich einerseits artspezifische morphologie- und virulenzassoziierte Gene und Genfamilien [135], andererseits traten transkriptionelle Neuerschaltungen auf [165]. Neben der Filamentierung konnte auch eine artspezifische Signalweiterleitung während der Chlamydosporulation in *Candida* spp. aufgedeckt werden, obwohl die zentralen Faktoren im Genom evolutionär erhalten blieben [62, 155].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hma1 ein neuartiger Repressor der Pseudohyphen- und Hyphenbildung als auch der Chlamydosporulation von *C. dubliniensis* beschrieben. Zugleich wirkte sich Hma1 spezifisch in *C. albicans* positiv auf die Hyphenlänge aus. Interessanterweise ist für eine *S. cerevisiae* *TCD2*-Überexpressionsmutante eine verstärkte Agar-Invasivität und Pseudohyphenbildung auf Stickstoffmangelmedium charakteristisch [302], ein Phänotyp, der stark an die *HMA1*-Effekte der *Candida* spp. erinnert. Da keine offensichtlich relevanten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Hma1-Proteine beider *Candida*-Spezies existieren, liegen artspezifische Regulation oder unterschiedliche Zielgene nahe. Spezifische Kandidaten für ct^6A -abhängig translatierte Transkripte wurden deshalb anhand der ANN-Triplet-Abundanz über zwei *in silico*-Analysen bestimmt. Für ähnliche t^6A -Modifikationen in Bäckerhefe ist bereits bekannt, dass sich potentielle Zieltranskripte besonders durch die Länge der Reihungen von ANN-Codons bestimmen lassen [118]. Deshalb wurden hier für beide *Candida*-Arten Gene mit langen ANN-Reihungen selektiert und über eine Genontologieanalyse ihren biologischen Funktionen zugeordnet. Unter diesen putativen Zielgenen fand sich eine Anreicherung von Transkriptionsfaktoren. Darunter sind diverse virulenz- oder morphologieassoziierte Faktoren – so traten spezifisch für *C. dubliniensis* die Filamentierungsdeterminanten *CdSFL2* und *CdUME6* auf. Beide Transkriptionsfaktoren wurden bereits im Zusammenhang mit dem artspezifischen Filamentierungsverhalten der *Candida*-Arten

beschrieben [65, 144], und sie könnten eine Ursache der speziesspezifischen Hyphenentwicklung der *ct⁶A*-negativen *C. albicans* und *C. dubliniensis*-Mutanten darstellen [212]. Der zweite bioinformatische Ansatz nutzte die Tatsache, dass es sechs verschiedene tRNA-Isoakzeptoren für Arginin gibt, von denen nur zwei Uridin in dritter 5' Anticodonposition tragen. Es wurde daher nach Genen gefiltert, welche Arginin ausschließlich häufig mit den entsprechenden ANN-Codons kodieren und somit von den Hma1-bedingten tRNA-Modifikationen betroffen sein könnten. Dies traf signifikant häufiger für Komponenten der Ribosomenbiosynthese und auf Transmembrantransporter zu. Insbesondere erstere wirken sich positiv auf den Translationsprozess per se aus und können so globale Effekte haben.

Die Wichtigkeit der anderen zuvor beschriebenen tRNA-Modifikation, die Wobble-Modifikationen durch die ELP- und Urm1-Uba4-Komplexe, für die Filamentierung von *S. cerevisiae* wurde bereits auf nährstoffarmen Medien, wie SLAD-Agar, nachgewiesen [46, 303]. Dass es sich dabei offenbar um einen zumindest partiell konservierten Mechanismus handelt, konnte hier erstmals in einer pathogenen Hefe gezeigt werden. Für *C. albicans ncs2Δ/Δ*-Mutanten trat eine eingeschränkte Hyphenbildung spezifisch unter infektionsassoziierten Bedingungen, wie nährstoffreichem Kochblutagar bei 37 °C (siehe Abbildung 19 im Anhang), auf und somit ähneln sich die *ct⁶A*- bzw. *mcm⁵s²U_{3,4}*-defekten *C. albicans*-Stämme in ihrem reduzierten Filamentierungsverhalten.

7.3.4 Pathogenitätsrelevante Stress- und Mangelantworten bedürfen korrekter tRNA-Modifikationen

Im Zuge einer Infektion sind mikrobielle Krankheitserreger mit vielfältigen Stressoren konfrontiert. So müssen sie in endothermen Wirten Temperaturen von mindestens 37 °C widerstehen können. Verminderte Thermotoleranz ist in vielen Spezies ein Merkmal von Mutanten mit defekter tRNA-Modifikation, die auch eine entscheidende Rolle für die Adaptation bei thermophilen bis extremophilen Bakterien und Archaeen spielt [304, 305]. Bei *S. cerevisiae* sind im Besonderen Mutanten des ELP-Urmylierungssystems, der Ncs2-Sulfidierung und des KEOPS-Komplex sowie der Tcd1/2-Dehydratasen in der Temperaturreistenz beeinträchtigt [5, 6, 306, 307]. Wie hier gezeigt werden konnte, verursacht auch der Verlust von *HMA1* in *C. albicans* und *C. dubliniensis* erhöhte Hitzesensitivität, was auf ähnliche zugrundeliegende Mechanismen hindeutet [212].

Der Grund für den hitzesensitiven Phänotyp der *tcd1Δ*- und *tcd2Δ*-*S. cerevisiae*-Mutanten ist die Häufung von Verschiebungen im Leserahmen 1+ und damit einhergehende Translationsdefekte, die bereits bei leichten Hitzestress auftreten und bei weiterer Temperaturerhöhung in einen Wachstumsdefekt münden [308]. Dies deutet bereits auf eine mögliche fehlerhafte Proteinbiosynthese auch von *Candida*-Mutanten unter infektionsrelevanten Bedingungen hin, auch wenn diese *in vitro* phänotypisch unauffällig bleiben können. Interessanterweise wurden negative synergistische Effekte von *S. cerevisiae tcd1Δ*- bzw. *tcd2Δ*-Mutanten mit Deletionen des Elongator-Komplexes und des Urmylierungsweges beschrieben, so dass eine *elp3Δ/tcd1Δ*-Doppelmutante signifikant mehr fehlgefaltete Proteine als die Einzelmutanten unter Hitze und weiteren Stressbedingungen akkumulierte [308, 309]. Da in *C. albicans* die Antwort auf ungefaltene Proteine direkten Einfluss auf

die Morphogenese nimmt [310], könnte eine Anhäufung von Proteinaggregaten in Stämmen mit defekter tRNA-Modifikation ein Grund für die Filamentierungsinsuffizienz sein.

tRNA-Thiolierungen, wie sie durch die Ncs2-Ncs6-Enzyme verknüpft werden, sind an der evolutionären Adaptation an verschiedene Temperaturen beteiligt. So weist beispielsweise die pathogene und hitzetolerante Hefe *C. glabrata* eine Korrelation von steigenden Temperaturen mit der Zunahme von schwefelhaltigen Modifikationen auf [306]. Entgegengesetzt reduzieren sich unter gleichen Bedingungen dieselben Modifikationen in *Saccharomyces bayanus*, einer Hefe mit einer maximalen Temperaturtoleranz von 34 °C [306]. Eine Punktmutation in *NCS2* wiederum war ursächlich für eine erhöhte Hitzeresistenz des pathogenen *S. cerevisiae*-Stamms [215]. Trotzdem führte in *C. albicans* die *NCS2*-Gendeletion zu keinem Wachstumsdefekt bei Temperaturen bis 42 °C. Stattdessen verbesserte sich in Kombination mit den Tor1-Antagonisten Rapamycin oder Koffein die Wachstumskapazität des Stamms unter Hitzestress sogar weit über das wildtypische Niveau (siehe Abbildung 20 im Anhang).

Neben der Temperaturtoleranz sind Stressresistenzen und effiziente Nährstoffakquisen im Wirtsorganismus weitere bedeutsame Virulenzattribute von Pathogenen. Im Gegensatz zu anderen tRNA-Modifikationen der ASL-Region [6, 111, 112], konnten für die hier untersuchten *Candida*-Arten keine Effekte nach dem Verlust von Hma1 in Gegenwart von osmotischen, oxidativen oder DNA-schädigenden Substanzen ermittelt werden. Während der Phagozytose gleicht das Transkriptom von *C. albicans* einer Kohlenhydratmangelantwort, und in solchen limitierten Nischen ist die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenhydrate von größter Bedeutung [311]. Während in *S. cerevisiae* die *tcd1A*- und *tcd2A*-Mutanten Glycerin nicht als einzige Kohlenstoffquelle verwerten können [5], war es den *ct⁶A*-defizienten *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämmen uneingeschränkt möglich alternative Kohlenhydrate zu assimilieren [212]. Dieser Effekt kann einerseits auf den grundlegenden Unterschieden der Kohlenhydratassimilation der Crabtree-negativen *Candida*-Arten und der -positiven *S. cerevisiae* beruhen. Andererseits waren bei einer Analyse des ANN-spezifischen Arginin-Codon Usages in *S. cerevisiae*, aber nicht in *Candida* spp., signifikant Gene der aeroben Respiration betroffen [6, 212], was eine mögliche Verbindung zwischen den modifizierten tRNAs und der Kohlenstoffnutzung von Hefe nahelegt.

Als Adaptation auf zellulären Stress und Hunger werden beispielsweise in *E. coli*, aber auch in Eukaryoten, Gene im überdurchschnittlichen Maß exprimiert, die durch seltene tRNA-Spezies translatiert werden [312]. In Hefen haben ANN-Codons eine durchschnittlich höhere Translationseffizienz im Vergleich zu anderen Codons, weshalb ein statistischer Trend zur starken Nutzung von ANN-tRNAs unter optimalen Wachstumsbedingungen besteht [6]. Veränderungen in der *ct⁶A*-Abundanz in den Expressions- und Deletionsstämmen können direkte Auswirkungen auf die Wachstumseffizienz haben und vor diesem Hintergrund lassen sich eine Reihe der phänotypischen, nährstoffabhängigen Auffälligkeiten begründen. Darunter fallen beispielsweise die Ergebnisse des ursprünglichen Screenings unter Stickstoffmangel bei dem die *C. albicans* *HMA1*-Kopie vermutlich die *ct⁶A*-Synthese verstärkt und die Mangelantwort in Form der Sporulation in *C. dubliniensis* unterdrückt.

In eukaryotischen Zellen wirken Nährstoffmangel, osmotischer und Hitzestress sowie die direkten Tor1-Antagonisten reprimierend auf den Serin-Threoninkinasekomplex TOR, und gleichzeitig werden unter diesen Bedingungen Katabolismus und Autophagie aktiviert, so dass die Zelle in die Ruhephase des Zellzyklus eintritt [201, 313]. Hma1 greift in diesen Mechanismus ein, da die ct^6A -negativen *Candida*-Mutanten Veränderungen in ihrer Rapamycin- und Kaffeintoleranz aufwiesen. Die verminderte Rapamycinresistenz von *C. dubliniensis* *Cdhma1Δ/Δ*-Mutanten ähnelt phänotypisch den KEOPS- und ELP-Komplex-defizienten *S. cerevisiae*-Stämmen [6, 112, 314]. Im Gegensatz dazu verbesserte sich das Wachstum von *C. albicans* *hma1Δ/Δ*-Deletionsstämmen unter Rapamycin- oder Kaffeinzugabe. Damit ist die Wechselwirkung zwischen dem tRNA-Modifikationsstatus und dem TOR-Signalweg generell konserviert, weist jedoch auch artspezifische Ausprägungen auf. Da der TOR-Weg auch die speziesspezifische Morphogenese in *Candida* spp. steuert [63, 155], können möglicherweise die Unterschiede in der Filamentierung der ct^6A -defekten Stämme auch auf artspezifische Verknüpfungen des TOR-Weges zurückgeführt werden. Ein Zusammenspiel der Tor1-Aktivierung und tRNA-Modifikationen ist auch in anderen Eukaryoten bekannt. In *Drosophila* phänotypieren KEOPS-Komplex-Mutanten die TOR-Inhibierung [111] und ein hypomodifizierter Adenosinrest an der Position 37 von tRNAs gilt als Risikofaktor einer TOR-Überfunktion, die ihrerseits zu einer Typ II Diabetes-Erkrankung in Säugetieren führen kann [315, 316].

Wie der Temperaturstress kann die veränderte Morphologie unter Stickstoffmangel bei *HMA1*-Expression ebenfalls im Zusammenhang mit der Stressantwort auf ungefaltete Proteine (UPR) stehen. Analoge Prozesse sind bekannt: Zum einen ist unter Stickstoffdefizit die UPR-Antwort in *S. cerevisiae* generell vermindert und führt so zur Pseudohyphenbildung [317], andererseits aktiviert Abwesenheit von t^6A in *Drosophila*-Larven und in *S. cerevisiae* den UPR-Mechanismus [6, 318]. Folglich könnte ein höheres ct^6A -Level in der *HMA1*-Expressionsmutante die UPR-Antwort reduzieren und so die Bildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen in *C. dubliniensis* unterdrücken. Welcher dieser vorgeschlagenen Mechanismen allein oder in Kombination mit anderen die Verbindung von tRNA-Modifikationen in *Candida*-Spezies zur phänotypischen Plastizität und Adaptation an den Wirt herstellt, bleibt noch zu untersuchen.

7.3.5 Komplexe Modifikationen der tRNA-Anticodonschleife sind entscheidend für die Virulenzattribute von *C. albicans* und anderer Pathogene

Die t^6A -Modifikation ist in allen Domänen des Lebens konserviert und ihr Verlust hat normalerweise schwerwiegende Folgen [116, 118, 298], so dass Eingriffe in den t^6A -Biosyntheseweg für die Mehrheit der bislang untersuchten Bakterien, inklusive vieler humanpathogener Vertreter (wie *Mycoplasma pulmonis*, *Salmonella* Typhi und *Staphylococcus aureus*) letal sind [319-321]. Komponenten des KEOPS-Komplexes sind deswegen auch als neuartige Zielstrukturen für die Antibiotikaentwicklung diskutiert worden [116]. Hingegen scheint die ct^6A -Adeninmodifikation für Eukaryoten entbehrlich zu sein, denn ein Mangel verursacht weder in der Bäckerhefe noch in den hier untersuchten *Candida*-Arten einen schwerwiegenden Wachstumsdefekt [5, 212]. Interessanterweise führten sie dennoch zu bedeutsamen Einschränkungen unter virulenzassoziierten Bedingungen.

Die Reduktion der Hyphenlänge einer *C. albicans hma1Δ/Δ*-Mutante in einer *in vitro*-Flüssigkultur war auch auf humanen oralen Epithelzellen zu beobachten [211, 212]. Ähnlich dem positiven Effekt von Tcd2 auf das invasive Wachstum der Bäckerhefe [302] führte zudem auch in *C. albicans* der Verlust von *HMA1* zu einer Verminderung der Invasivität auf Agaroberflächen und auf humanen Epithelien. Der Fall ist bei *NCS2* anders gelagert: Obwohl die *NCS2*-Expression in *S. cerevisiae* sowohl mit der Filamentierung als auch der Agarinvasion verknüpft ist [322], konnte in *C. albicans ncs2Δ/Δ*-Mutanten zwar eine reduzierte Hyphenentwicklung auf Festmedien, aber nicht auf oraler Einzelschichtkultur gemessen werden (hier und [211]). Trotz dessen scheint *NCS2* die Virulenz von *C. albicans* zu beeinflussen, da eine Deletionsmutante bei unveränderter Adhärenz und Invasion weniger Zellschädigung verursachte [211].

Informationen über die Rolle von tRNA-Modifikationen in pathogenen Pilzen sind rar. Für den phytopathogenen Erreger der Gurken-Anthraknose, *Colletotrichum lagenarium*, führten Defekte der 7-Methylguanosinmodifikation zu einer reduzierten Wirtszellpenetration [323] – einem Effekt mit mechanistischer Ähnlichkeit zu dem von *C. albicans hma1Δ/Δ*-Mutanten auf oralen Zellen. Die Effekte niedriger ct^6A -Level auf die Hyphenelongation, Adhärenz und Invasion in Gegenwart von Wirtszellen gaben Hinweise auf eine Beteiligung von Hma1 während einer *Candida*-Infektion. Die Rolle unter *in vivo*-Bedingungen wurde deshalb in einem Infektionsmodell mit embryonierten Hühnereiern [156, 184] charakterisiert. Die Embryonen, welche mit den *C. albicans hma1Δ/Δ*-Deletionsmutanten infiziert worden, zeigten eine signifikant höhere Überlebensrate als jene, die eine Infektion mit dem Wildtyp- oder dem rekonstruierten Stamm durchliefen [212]. Auch in pathogenen Bakterien sind tRNA-Modifikationen an der ASL von großer Wichtigkeit in Tierinfektionsmodellen, so dass beispielsweise die Virulenz und Kolonisation im Mausmodell eines $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ -defizitären *Salmonella*-Stamms stark attenuiert war [324].

Interessanterweise ist Hma1 ein pilzspezifischer Faktor ohne Ortholog im Menschen oder anderen Säugern (<http://www.candidagenome.org/> Stand Juni 2017) und damit könnten Hma1, wie auch ähnliche tRNA-Modifizierer, neue Wirkstofftargets für eukaryotische mikrobielle Pathogene darstellen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit cotranslationale Ereignisse – als dynamisch epigenetische Prozesse der Proteinbiosynthese – erstmals als bedeutsame und bisher häufig unterschätzte Faktoren für die Anpassung von kommensalen, fakultativ pathogenen *Candida*-Arten an den Wirt identifiziert und charakterisiert werden. Im Detail wurde erstmalig ein entscheidender Einfluss der tRNA-modifizierenden Enzyme Hma1 und Ncs2 auf die Pathobiologie von *C. albicans* dargestellt. Durch die Verbindungen im TOR-Signalnetzwerk liegt eine Rolle der ct⁶A-Modifikation auf den nährstoffabhängigen Morphologiewechsel nahe. Mechanistisch scheint der Verlust der tRNA-Modifikation direkten Einfluss auf die Translationseffizienz zu haben, von dem im Besonderen Transkriptionsfaktoren betroffen sind, die ihrerseits an der Expression virulenzassoziiierter Gene beteiligt sind. Folgerichtig führten Defekte der hier beschriebenen tRNA-Modifikationen über mehrere unabhängige Signalwege zur Attenuierung der Virulenz und mit ihr assoziierter Prozesse in humanpathogenen Hefen.

8 Literaturverzeichnis

1. Groll, A., et al., *Diagnose und Therapie von Candida-Infektionen, Gemeinsame Empfehlungen der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMYKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG)*. Chemother J, 2016. **20**: p. 67-93.
2. Patel, P.K., et al., *The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with HIV/AIDS in the era of antiretroviral therapy*. AIDS research and treatment, 2012. **2012**.
3. Sullivan, D.J., et al., *Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals*. Microbiology, 1995. **141**(7): p. 1507-1521.
4. Kim, M.-J., et al., *Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast Candida albicans*. Journal of microbiology and biotechnology, 2008. **18**(2): p. 242-247.
5. Miyauchi, K., S. Kimura, and T. Suzuki, *A cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification*. Nature chemical biology, 2013. **9**(2): p. 105-111.
6. Thiaville, P.C., et al., *Global translational impacts of the loss of the tRNA modification t(6)A in yeast*. Microbial cell, 2016. **3**(1): p. 29-45.
7. Brown, G.D., et al., *Hidden Killers: Human Fungal Infections*. Science Translational Medicine, 2012. **4**(165): p. 165rv13-165rv13.
8. Xu, H., et al., *The α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi*. Cell biochemistry and biophysics, 2006. **46**(1): p. 43-64.
9. Brown, G.D., D.W. Denning, and S.M. Levitz, *Tackling Human Fungal Infections*. Science, 2012. **336**(6082): p. 647-647.
10. Blackwell, M., *The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?* American journal of botany, 2011. **98**(3): p. 426-438.
11. Casadevall, A., *Amoeba Provide Insight into the Origin of Virulence in Pathogenic Fungi*, in *Recent Advances on Model Hosts*, E. Mylonakis, et al., Editors. 2012, Springer New York: New York, NY. p. 1-10.
12. Kronstad, J.W., et al., *Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box*. Nat Rev Micro, 2011. **9**(3): p. 193-203.
13. Schulze, J. and U. Sonnenborn, *Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents*. Deutsches Ärzteblatt International, 2009. **106**(51-52): p. 837-842.
14. Willing, B.P., S.L. Russell, and B.B. Finlay, *Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism*. Nat Rev Micro, 2011. **9**(4): p. 233-243.
15. Enache-Angoulvant, A. and C. Hennequin, *Invasive Saccharomyces infection: a comprehensive review*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(11): p. 1559-1568.
16. Underhill, D.M. and I.D. Iliev, *The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(6): p. 405-416.
17. Akpan, A. and R. Morgan, *Oral candidiasis*. Postgraduate Medical Journal, 2002. **78**(922): p. 455-459.
18. Naglik, J.R., et al., *Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2011. **13**(12-13): p. 963-976.
19. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem*. Clinical Microbiology Reviews, 2007. **20**(1): p. 133-163.
20. Marshall, J.C., N.V. Christou, and J.L. Meakins, *The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure*. Annals of Surgery, 1993. **218**(2): p. 111-119.
21. Kullberg, B.J. and M.C. Arendrup, *Invasive Candidiasis*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(15): p. 1445-1456.
22. Nguyen, M., et al., *Therapeutic approaches in patients with candidemia: Evaluation in a multicenter, prospective, observational study*. Archives of Internal Medicine, 1995. **155**(22): p. 2429-2435.

23. Takahashi, Y., et al., *Long-Term Trends in Esophageal Candidiasis Prevalence and Associated Risk Factors with or without HIV Infection: Lessons from an Endoscopic Study of 80,219 Patients*. PLoS ONE, 2015. **10**(7): p. e0133589.
24. Kim, J.-Y., *Human fungal pathogens: Why should we learn?* Journal of Microbiology, 2016. **54**(3): p. 145-148.
25. Figueiredo, S.M., et al., *Cerebral macroabscess caused by Candida albicans in an immunocompetent patient: A diagnostic challenge*. Medical Mycology Case Reports, 2014. **3**: p. 17-19.
26. Manolakaki, D., et al., *Candida infection and colonization among trauma patients*. Virulence, 2010. **1**(5): p. 367-375.
27. Sobel, J.D., *Vulvovaginal candidosis*. The Lancet. **369**(9577): p. 1961-1971.
28. Bondaryk, M., W. Kurzątkowski, and M. Staniszevska, *Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development*. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii, 2013. **30**(5): p. 293-301.
29. Hoyer, L.L., et al., *Candida albicans ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family*. Current genetics, 1998. **33**(6): p. 451-459.
30. Wächter, B., et al., *From Attachment to Damage: Defined Genes of Candida albicans Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells*. PLoS ONE, 2011. **6**(2): p. e17046.
31. Wächter, B., et al., *Candida albicans-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process*. PLoS ONE, 2012. **7**(5): p. e36952.
32. Schaller, M., et al., *Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans*. Mycoses, 2005. **48**(6): p. 365-377.
33. Moyes, D.L., et al., *Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection*. Nature, 2016. **532**(7597): p. 64-68.
34. Mayer, F.L., D. Wilson, and B. Hube, *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence, 2013. **4**(2): p. 119-128.
35. Sudbery, P.E., *Growth of Candida albicans hyphae*. Nat Rev Micro, 2011. **9**(10): p. 737-748.
36. Martin, R., et al., *A core filamentation response network in Candida albicans is restricted to eight genes*. PLoS one, 2013. **8**(3): p. e58613.
37. Biswas, S., P. Van Dijk, and A. Datta, *Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of Candida albicans*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007. **71**(2): p. 348-376.
38. Yokoyama, K., et al., *The role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of Candida albicans*. Microbiology, 1990. **136**(6): p. 1067-1075.
39. Jones, L.A. and P.E. Sudbery, *Spitzenkörper, Exocyst, and Polarisome Components in Candida albicans Hyphae Show Different Patterns of Localization and Have Distinct Dynamic Properties*. Eukaryotic Cell, 2010. **9**(10): p. 1455-1465.
40. Crampin, H., et al., *Candida albicans hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(13): p. 2935-2947.
41. Lo, H.-J., et al., *Nonfilamentous C. albicans Mutants Are Avirulent*. Cell, 1997. **90**(5): p. 939-949.
42. Krysan, D.J., F.S. Sutterwala, and M. Wellington, *Catching fire: Candida albicans, macrophages, and pyroptosis*. PLoS Pathog, 2014. **10**(6): p. e1004139.
43. Noble, S.M., B.A. Gianetti, and J.N. Witchley, *Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host*. Nat Rev Micro, 2017. **15**(2): p. 96-108.
44. Sabina, J. and V. Brown, *Glucose Sensing Network in Candida albicans: a Sweet Spot for Fungal Morphogenesis*. Eukaryotic Cell, 2009. **8**(9): p. 1314-1320.
45. Hudson, D.A., et al., *Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in Candida albicans*. Microbiology, 2004. **150**(9): p. 3041-3049.
46. Laxman, S. and B.P. Tu, *Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-dependent cellular differentiation in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS one, 2011. **6**(10): p. e26081.

47. Silva, S., et al., *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. FEMS Microbiology Reviews, 2012. **36**(2): p. 288-305.
48. Biswas, K. and J. Morschhäuser, *The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in Candida albicans*. Molecular Microbiology, 2005. **56**(3): p. 649-669.
49. Bensen, E.S., et al., *Transcriptional profiling in Candida albicans reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p*. Molecular Microbiology, 2004. **54**(5): p. 1335-1351.
50. Leberer, E., et al., *Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus Candida albicans*. Molecular Microbiology, 2001. **42**(3): p. 673-687.
51. Lu, Y., et al., *Hyphal Development in Candida albicans Requires Two Temporally Linked Changes in Promoter Chromatin for Initiation and Maintenance*. PLoS Biol, 2011. **9**(7): p. e1001105.
52. Citiulo, F., et al., *Purification and germination of Candida albicans and Candida dubliniensis chlamydospores cultured in liquid media*. FEMS Yeast Research, 2009. **9**(7): p. 1051-1060.
53. Jansons, V.K. and W.J. Nickerson, *Chemical Composition of Chlamydospores of Candida albicans*. Journal of Bacteriology, 1970. **104**(2): p. 922-932.
54. Jansons, V.K. and W.J. Nickerson, *Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of Candida albicans*. J Bacteriol, 1970. **104**(2): p. 910-21.
55. Sonneborn, A., D.P. Bockmühl, and J.F. Ernst, *Chlamydospore Formation in Candida albicans Requires the Efg1p Morphogenetic Regulator*. Infection and Immunity, 1999. **67**(10): p. 5514-5517.
56. Kapica, L., A. Clifford, and M. Noik, *„Room temperature“ incubation for chlamydospore production by Candida albicans*. Mycopathologia et mycologia applicata, 1969. **37**(4): p. 338-344.
57. Dujardin, L., S. Walbaum, and J. Biguet, *Chlamydosporulation de Candida albicans: déroulement de la morphogenese; influence de la lumiere et de la densite d'ensemencement*. Ann Microbiol (Paris), 1980. **131A**(2): p. 141-9.
58. Dujardin, L., S. Walbaum, and J. Biguet, *Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of Candida albicans and the formation of chlamydospores in synthetic culture media*. Mycopathologia, 1980. **71**(2): p. 113-118.
59. Jansons, V.K. and W.J. Nickerson, *Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of Candida albicans*. Journal of bacteriology, 1970. **104**(2): p. 910-921.
60. Staib, P. and J. Morschhäuser, *Chlamydospore formation in Candida albicans and Candida dubliniensis— an enigmatic developmental programme*. Mycoses, 2007. **50**(1): p. 1-12.
61. Nobile, C.J., et al., *Genetic control of chlamydospore formation in Candida albicans*. Microbiology, 2003. **149**(12): p. 3629-3637.
62. Staib, P. and J. Morschhäuser, *Differential expression of the NRG1 repressor controls species-specific regulation of chlamydospore development in Candida albicans and Candida dubliniensis*. Mol Microbiol, 2005. **55**(2): p. 637-52.
63. Sullivan, D. and G.P. Moran, *Differential virulence of Candida albicans and C. dubliniensis: A role for Tor1 kinase?* Virulence, 2011. **2**(1): p. 77-81.
64. Caplice, N. and G.P. Moran, *Candida albicans exhibits enhanced alkaline and temperature induction of Efg1-regulated transcripts relative to Candida dubliniensis*. Genomics Data, 2015. **6**: p. 130-135.
65. O'Connor, L., et al., *Differential filamentation of Candida albicans and Candida dubliniensis is governed by nutrient regulation of UME6 expression*. Eukaryotic cell, 2010. **9**(9): p. 1383-1397.
66. Moran, G.P., et al., *Differential regulation of the transcriptional repressor NRG1 accounts for altered host-cell interactions in Candida albicans and Candida dubliniensis*. Molecular Microbiology, 2007. **66**(4): p. 915-929.
67. Stevenson, I.L. and S.A. Becker, *The fine structure and development of chlamydospores of Fusarium oxysporum*. Can J Microbiol, 1972. **18**(7): p. 997-1002.

68. Lin, X. and J. Heitman, *Chlamydo-spore Formation during Hyphal Growth in Cryptococcus neoformans*. Eukaryotic Cell, 2005. **4**(10): p. 1746-1754.
69. Noble, S.M. and A.D. Johnson, *Genetics of Candida albicans, a diploid human fungal pathogen*. Annu. Rev. Genet., 2007. **41**: p. 193-211.
70. Hickman, M.A., et al., *The 'obligate diploid' Candida albicans forms mating-competent haploids*. Nature, 2013. **494**(7435): p. 55-59.
71. Hennigar, S.R. and J.P. McClung, *Nutritional Immunity: Starving Pathogens of Trace Minerals*. American Journal of Lifestyle Medicine, 2016.
72. Hood, M.I. and E.P. Skaar, *Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface*. Nat Rev Micro, 2012. **10**(8): p. 525-537.
73. Botella, H., et al., *Mycobacterial PI-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages*. Cell Host & Microbe, 2011. **10**(3): p. 248-259.
74. Weissman, Z., et al., *An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in Candida albicans*. Molecular Microbiology, 2008. **69**(1): p. 201-217.
75. Almeida, R.S., et al., *The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of Candida albicans mediates iron acquisition from host ferritin*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000217.
76. Andreini, C., et al., *Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome*. Journal of Proteome Research, 2006. **5**(1): p. 196-201.
77. Braymer, J.J. and D.P. Giedroc, *Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens*. Current Opinion in Chemical Biology, 2014. **19**: p. 59-66.
78. Hwang, C.-S., et al., *Copper-and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of Candida albicans against oxidative stresses and the expression of its full virulence*. Microbiology, 2002. **148**(11): p. 3705-3713.
79. Gleason, J.E., et al., *Species-specific activation of Cu/Zn SOD by its CCS copper chaperone in the pathogenic yeast Candida albicans*. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2014. **19**(4): p. 595-603.
80. Brophy, M.B., J.A. Hayden, and E.M. Nolan, *Calcium Ion Gradients Modulate the Zinc Affinity and Antibacterial Activity of Human Calprotectin*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(43): p. 18089-18100.
81. Cerasi, M., S. Ammendola, and A. Battistoni, *Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2013. **3**: p. 108.
82. Wilson, S. and A.J. Bird, *Zinc sensing and regulation in yeast model systems*. Archives of biochemistry and biophysics, 2016.
83. Wu, C.-Y., et al., *Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genomics, 2008. **9**(1): p. 1.
84. Ballou, E.R. and D. Wilson, *The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis*. Current Opinion in Microbiology, 2016. **32**: p. 128-134.
85. Capdevila, D.A., J. Wang, and D.P. Giedroc, *Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(40): p. 20858-20868.
86. Graham, A.I., et al., *Severe Zinc Depletion of Escherichia coli: ROLES FOR HIGH AFFINITY ZINC BINDING BY ZinT, ZINC TRANSPORT AND ZINC-INDEPENDENT PROTEINS*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(27): p. 18377-18389.
87. Ganguly, S., et al., *Zap1 control of cell-cell signaling in Candida albicans biofilms*. Eukaryotic cell, 2011. **10**(11): p. 1448-1454.
88. Nobile, C.J., et al., *Biofilm matrix regulation by Candida albicans Zap1*. PLoS Biol, 2009. **7**(6): p. e1000133.
89. Finkel, J.S., et al., *Portrait of Candida albicans Adherence Regulators*. PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002525.
90. Forche, A., et al., *The parasexual cycle in Candida albicans provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains*. PLoS Biol, 2008. **6**(5): p. e110.
91. Brown, S.P., D.M. Cornforth, and N. Mideo, *Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control*. Trends in Microbiology, 2012. **20**(7): p. 336-342.
92. Everett, L.J., S.T. Jensen, and S. Hannenhalli, *Transcriptional regulation via TF-modifying enzymes: an integrative model-based analysis*. Nucleic acids research, 2011: p. gkr172.

93. Pabo, C.O. and R.T. Sauer, *Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition*. Annual review of biochemistry, 1992. **61**(1): p. 1053-1095.
94. Todd, R.B., et al., *Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi*. BMC Genomics, 2014. **15**(1): p. 214.
95. MacPherson, S., M. Larochelle, and B. Turcotte, *A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. **70**(3): p. 583-604.
96. Vandeputte, P., et al., *In Vivo Systematic Analysis of Candida albicans Zn2-Cys6 Transcription Factors Mutants for Mice Organ Colonization*. PLoS ONE, 2011. **6**(10): p. e26962.
97. Amorim-Vaz, S., et al., *Examining the virulence of Candida albicans transcription factor mutants using Galleria mellonella and mouse infection models*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**: p. 367.
98. Staib, P., et al., *Differential activation of a Candida albicans virulence gene family during infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(11): p. 6102-6107.
99. Naglik, J.R., et al., *Quantitative expression of the Candida albicans secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis*. Microbiology (Reading, England), 2008. **154**(Pt 11): p. 3266-3280.
100. Dagley, M.J., et al., *Cell wall integrity is linked to mitochondria and phospholipid homeostasis in Candida albicans through the activity of the post-transcriptional regulator Ccr4-Pop2*. Molecular Microbiology, 2011. **79**(4): p. 968-989.
101. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 227-232.
102. Pestova, T.V., C. Hellen, and I.N. Shatsky, *Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(12): p. 6859-6869.
103. Gallie, D.R., *The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency*. Genes & Development, 1991. **5**(11): p. 2108-2116.
104. Waldron, C. and F. Lacroute, *Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast*. Journal of bacteriology, 1975. **122**(3): p. 855-865.
105. Sharp, P.M. and W.-H. Li, *The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications*. Nucleic Acids Research, 1987. **15**(3): p. 1281-1295.
106. El Yacoubi, B., M. Bailly, and V. de Crécy-Lagard, *Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs*. Annual review of genetics, 2012. **46**: p. 69-95.
107. Duechler, M., et al., *Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**: p. 3075-3095.
108. Machnicka, M.A., et al., *MODOMICS: a database of RNA modification pathways—2013 update*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(Database issue): p. D262-D267.
109. Jackman, J.E. and J.D. Alfonzo, *Transfer RNA modifications: Nature's combinatorial chemistry playground*. Wiley interdisciplinary reviews. RNA, 2013. **4**(1): p. 35-48.
110. Machnicka, M.A., et al., *Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs*. RNA Biology, 2014. **11**(12): p. 1619-1629.
111. Rojas-Benitez, D., et al., *The Levels of a Universally Conserved tRNA Modification Regulate Cell Growth*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(30): p. 18699-18707.
112. Thiaville, P.C. and V. de Crécy-Lagard, *The emerging role of complex modifications of tRNA(Lys)(UUU) in signaling pathways*. Microbial cell, 2015. **2**(1): p. 1-4.
113. Karlsborn, T., et al., *Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in Eukaryotes*. RNA Biology, 2014. **11**(12): p. 1519-1528.
114. Noma, A., Y. Sakaguchi, and T. Suzuki, *Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(4): p. 1335-1352.
115. Laxman, S., et al., *Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation*. Cell, 2013. **154**(2): p. 416-429.

116. Deutsch, C., et al., *Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t⁶A), a universal tRNA nucleoside*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(17): p. 13666-13673.
117. Matuszewski, M., et al., *A hydantoin isoform of cyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ct6A) is present in tRNAs*. Nucleic Acids Research, 2016.
118. Thiaville, P.C., et al., *Essentiality of threonylcarbamoyladenine (t6A), a universal tRNA modification, in bacteria*. Molecular Microbiology, 2015. **98**(6): p. 1199-1221.
119. Chopra, S. and J. Reader, *tRNAs as Antibiotic Targets*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(1): p. 321-349.
120. Cheetham, J., et al., *MAPKKK-independent Regulation of the Hog1 Stress-activated Protein Kinase in Candida albicans*. The Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(49): p. 42002-42016.
121. Alonso-Monge, R., et al., *The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 2003. **2**(2): p. 351-361.
122. Eisman, B., et al., *The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 2006. **5**(2): p. 347-358.
123. Pendrak, M.L. and S.A. Klotz, *Adherence of Candida albicans to host cells*. FEMS microbiology letters, 1995. **129**(2-3): p. 103-113.
124. Mora-Montes, H.M., et al., *Endoplasmic Reticulum α -Glycosidases of Candida albicans Are Required for N-Glycosylation, Cell Wall Integrity, and Normal Host-Fungus Interaction*. Eukaryotic Cell, 2007. **6**(12): p. 2184-2193.
125. Leach, M.D., et al., *Molecular and proteomic analyses highlight the importance of ubiquitination for the stress resistance, metabolic adaptation, morphogenetic regulation and virulence of Candida albicans*. Molecular Microbiology, 2011. **79**(6): p. 1574-1593.
126. Simonetti, G., et al., *Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in Candida albicans*. FEMS Yeast Research, 2007. **7**(8): p. 1371-1380.
127. Sullivan, D., et al., *Widespread geographic distribution of oral Candida dubliniensis strains in human immunodeficiency virus-infected individuals*. Journal of Clinical Microbiology, 1997. **35**(4): p. 960-964.
128. Willis, A., et al., *Isolation of C. dubliniensis from insulin-using diabetes mellitus patients*. Journal of oral pathology & medicine, 2000. **29**(2): p. 86-90.
129. Sebtí, A., et al., *Candida dubliniensis at a Cancer Center*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **32**(7): p. 1034-1038.
130. Loreto, É.S., et al., *Candida dubliniensis: Epidemiology and Phenotypic Methods for Identification*. Mycopathologia, 2010. **169**(6): p. 431-443.
131. Moran, G.P., et al., *Antifungal drug susceptibilities of oral Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997. **41**(3): p. 617-623.
132. Khan, Z., et al., *Candida dubliniensis: An Appraisal of Its Clinical Significance as a Bloodstream Pathogen*. PLoS ONE, 2012. **7**(3): p. e32952.
133. Carr, M.J., et al., *First reported case of endocarditis caused by Candida dubliniensis*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(6): p. 3023-3026.
134. Sebastian, J.v.H., et al., *Candida dubliniensis Meningitis as Delayed Sequela of Treated C. dubliniensis Fungemia*. Emerging Infectious Disease journal, 2008. **14**(2): p. 327.
135. Jackson, A.P., et al., *Comparative genomics of the fungal pathogens Candida dubliniensis and Candida albicans*. Genome Research, 2009. **19**(12): p. 2231-2244.
136. Meis, J., et al., *Candida dubliniensis candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation*. Emerging infectious diseases, 1999. **5**(1): p. 150.
137. Kibbler, C.C., et al., *Management and outcome of bloodstream infections due to Candida species in England and Wales*. Journal of Hospital Infection, 2003. **54**(1): p. 18-24.
138. Papon, N., et al., *Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the Candida albicans Paradigm*. PLoS Pathogens, 2013. **9**(9): p. e1003550.

139. McManus, B.A., et al., *Multilocus sequence typing reveals that the population structure of Candida dubliniensis is significantly less divergent than that of Candida albicans*. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(2): p. 652-664.
140. Ibelings, M.S., et al., *Rapid identification of Candida spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy*. Clinical Microbiology and Infection, 2005. **11**(5): p. 353-358.
141. Graf, B., et al., *Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(5): p. 1782-1785.
142. Gales, A.C., et al., *Identification of Candida dubliniensis Based on Temperature and Utilization of Xylose and α -Methyl-d-Glucoside as Determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(12): p. 3804-3808.
143. Moran, G.P., D.C. Coleman, and D.J. Sullivan, *Candida albicans versus Candida dubliniensis: Why Is C. albicans More Pathogenic?* International Journal of Microbiology, 2012. **2012**: p. 7.
144. Spiering, M.J., et al., *Comparative transcript profiling of Candida albicans and Candida dubliniensis identifies SFL2, a C. albicans gene required for virulence in a reconstituted epithelial infection model*. Eukaryotic cell, 2010. **9**(2): p. 251-265.
145. Sullivan, D. and D. Coleman, *Candida dubliniensis: characteristics and identification*. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(2): p. 329-334.
146. Stokes, C., et al., *Lower filamentation rates of Candida dubliniensis contribute to its lower virulence in comparison with Candida albicans*. Fungal Genetics and Biology, 2007. **44**(9): p. 920-931.
147. Pöllath, C., *Identifizierung und Charakterisierung Chlamydosporenspezifischer Gene in Candida dubliniensis und Candida albicans*, in *HKI, Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen*. 2015, FSU Jena.
148. Staib, P. and J. Morschhäuser, *Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of Candida dubliniensis*. Mycoses, 1999. **42**(9-10): p. 521-524.
149. Khan, Z.U., et al., *Tobacco agar, a new medium for differentiating Candida dubliniensis from Candida albicans*. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(10): p. 4796-4798.
150. Mosca, C.O., et al., *Casein agar: a useful medium for differentiating Candida dubliniensis from Candida albicans*. Journal of clinical microbiology, 2003. **41**(3): p. 1259-1262.
151. Palige, K., et al., *Global Transcriptome Sequencing Identifies Chlamydospore Specific Markers in Candida albicans and Candida dubliniensis*. PLoS ONE, 2013. **8**(4): p. e61940.
152. Enjalbert, B., et al., *Genome-wide gene expression profiling and a forward genetic screen show that differential expression of the sodium ion transporter Ena21 contributes to the differential tolerance of Candida albicans and Candida dubliniensis to osmotic stress*. Molecular microbiology, 2009. **72**(1): p. 216-228.
153. Abegg, M.A., et al., *Response to Oxidative Stress in Eight Pathogenic Yeast Species of the Genus Candida*. Mycopathologia, 2010. **170**(1): p. 11-20.
154. Sheth, C.C., et al., *Phenotypic identification of Candida albicans by growth on chocolate agar*. Medical mycology, 2005. **43**(8): p. 735-738.
155. Böttcher, B., et al., *Candida species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamydospore Formation*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**(1697).
156. Böttcher, B., et al., *Csr1/Zap1 Maintains Zinc Homeostasis and Influences Virulence in Candida dubliniensis but Is Not Coupled to Morphogenesis*. Eukaryotic Cell, 2015. **14**(7): p. 661-670.
157. Murciano, C., et al., *Evaluation of the Role of Candida albicans Agglutinin-Like Sequence (Als) Proteins in Human Oral Epithelial Cell Interactions*. PLoS ONE, 2012. **7**(3): p. e33362.
158. Staab, J.F., et al., *Adhesive and Mammalian Transglutaminase Substrate Properties of Candida albicans Hwp1*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1535-1538.
159. Luo, G., et al., *Candida albicans Hyr1p Confers Resistance to Neutrophil Killing and Is a Potential Vaccine Target*. The Journal of infectious diseases, 2010. **201**(11): p. 1718-1728.
160. McManus, B.A. and D.C. Coleman, *Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Candida albicans*. Infection, Genetics and Evolution, 2014. **21**: p. 166-178.
161. Naglik, J.R., S.J. Challacombe, and B. Hube, *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis*. Microbiology and molecular biology reviews, 2003. **67**(3): p. 400-428.

162. Liu, Z., et al., *Amplification of TLO Mediator Subunit Genes Facilitate Filamentous Growth in Candida Spp.* PLoS Genet, 2016. **12**(10): p. e1006373.
163. Haran, J., et al., *Telomeric ORFs (TLO) Candida spp. Encode Mediator Subunits That Regulate Distinct Virulence Traits.* PLoS Genet, 2014. **10**(10): p. e1004658.
164. Fichtner, M., *Ermittlung spezies-spezifischer Virulenzfaktoren in pathogenen Candida-Spezies*, in *HKI, Systembiologie und Bioinformatik*. 2013, FSU Jena.
165. Grumaz, C., et al., *Species and condition specific adaptation of the transcriptional landscapes in Candida albicans and Candida dubliniensis.* BMC genomics, 2013. **14**(1): p. 1.
166. Japutra, C.D., *Characterization of ZCF Transcription Factors That Are Expanded in the Human Pathogen Candida albicans.* 2014, Worchester Polytechnic Institute.
167. Kalman, S., et al., *Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis.* Nature Genetics, 1999. **21**(4): p. 385-389.
168. Westermann, A.J., S.A. Gorski, and J. Vogel, *Dual RNA-seq of pathogen and host.* Nature Reviews Microbiology, 2012. **10**(9): p. 618-630.
169. Xu, W., et al., *Activation and alliance of regulatory pathways in C. albicans during mammalian infection.* PLoS Biol, 2015. **13**(2): p. e1002076.
170. Sohn, K., et al., *EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in Candida albicans as revealed by DNA microarrays.* Molecular Microbiology, 2003. **47**(1): p. 89-102.
171. Walker, L.A., et al., *Genome-wide analysis of Candida albicans gene expression patterns during infection of the mammalian kidney.* Fungal Genetics and Biology, 2009. **46**(2): p. 210-219.
172. Peterson, G., et al., *Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in Salmonella enterica of human or animal origin.* Journal of veterinary diagnostic investigation, 2010. **22**(4): p. 559-569.
173. Vilela, M., et al., *Pathogenicity and virulence of Candida dubliniensis: comparison with C. albicans.* Medical Mycology, 2009.
174. Su, C., Y. Lu, and H. Liu, *Reduced TOR signaling sustains hyphal development in Candida albicans by lowering Hog1 basal activity.* Molecular Biology of the Cell, 2013. **24**(3): p. 385-397.
175. Zacchi, L.F., J. Gomez-Raja, and D.A. Davis, *Mds3 regulates morphogenesis in Candida albicans through the TOR pathway.* Molecular and cellular biology, 2010. **30**(14): p. 3695-3710.
176. Gillum, A.M., E.Y. Tsay, and D.R. Kirsch, *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, 1984. **198**(2): p. 179-82.
177. Fonzi, W.A. and M.Y. Irwin, *Isogenic strain construction and gene mapping in Candida albicans.* Genetics, 1993. **134**(3): p. 717-28.
178. Noble, S.M. and A.D. Johnson, *Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen Candida albicans.* Eukaryotic cell, 2005. **4**(2): p. 298-309.
179. Morschhäuser, J., et al., *Identification of CARE-2-negative Candida albicans isolates as Candida dubliniensis.* Mycoses, 1999. **42**(1-2): p. 29-32.
180. Staib, P., et al., *Isogenic Strain Construction and Gene Targeting in Candida dubliniensis.* Journal of bacteriology, 2001. **183**(9): p. 2859-2865.
181. Reuß, O., et al., *The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in Candida albicans.* Gene, 2004. **341**: p. 119-127.
182. Staib, P., et al., *Differential activation of a Candida albicans virulence gene family during infection.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(11): p. 6102-6107.
183. Hennicke, F., et al., *Factors Supporting Cysteine Tolerance and Sulfite Production in Candida albicans.* Eukaryotic Cell, 2013. **12**(4): p. 604-613.
184. Jacobsen, I.D., et al., *Pathogenesis of Candida albicans Infections in the Alternative Chorio-Allantoic Membrane Chicken Embryo Model Resembles Systemic Murine Infections.* PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. e19741.
185. Prysycz, L.P., J. Huerta-Cepas, and T. Gabaldón, *MetaPhOrs: orthology and paralogy predictions from multiple phylogenetic evidence using a consistency-based confidence score.* Nucleic Acids Research, 2011. **39**(5): p. e32-e32.

186. Zdobnov, E.M. and R. Apweiler, *InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro*. *Bioinformatics*, 2001. **17**(9): p. 847-848.
187. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database*. *Nucleic Acids Research*, 2008. **36**(Database issue): p. D281-D288.
188. Pinjon, E., et al., *Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*, 1998. **36**(7): p. 2093-2095.
189. Tripathi, G., et al., *Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in Candida albicans*. *The EMBO Journal*, 2002. **21**(20): p. 5448-5456.
190. Kingsbury, J.M., J. Heitman, and S.R. Pinnell, *Calcofluor White Combination Antifungal Treatments for Trichophyton rubrum and Candida albicans*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(7): p. e39405.
191. Pfaller, M.A., et al., *In Vitro Susceptibilities of Candida spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006. **44**(3): p. 760-763.
192. Diezmann, S., *Oxidative stress response and adaptation to H₂O₂ in the model eukaryote Saccharomyces cerevisiae and its human pathogenic relatives Candida albicans and Candida glabrata*. *Fungal Biology Reviews*, 2014. **28**(4): p. 126-136.
193. Ruiz, A. and J. Ariño, *Function and regulation of the Saccharomyces cerevisiae ENA sodium ATPase system*. *Eukaryotic cell*, 2007. **6**(12): p. 2175-2183.
194. Miermont, A., et al., *Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. **110**(14): p. 5725-5730.
195. Hill, T.W., et al., *Isolation of cell wall mutants in Aspergillus nidulans by screening for hypersensitivity to Calcofluor White*. *Mycologia*, 2006. **98**(3): p. 399-409.
196. Avery, S.V., N.G. Howlett, and S. Radice, *Copper toxicity towards Saccharomyces cerevisiae: dependence on plasma membrane fatty acid composition*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(11): p. 3960-3966.
197. De Freitas, J., et al., *Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies*. *Biometals*, 2003. **16**(1): p. 185-197.
198. Rand, J.D. and C.M. Grant, *The Thioredoxin System Protects Ribosomes against Stress-induced Aggregation*. *Molecular Biology of the Cell*, 2006. **17**(1): p. 387-401.
199. Morschhäuser, J., *The development of fluconazole resistance in Candida albicans – an example of microevolution of a fungal pathogen*. *Journal of Microbiology*, 2016. **54**(3): p. 192-201.
200. Kuranda, K., et al., *Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways*. *Molecular Microbiology*, 2006. **61**(5): p. 1147-1166.
201. Loewith, R. and M.N. Hall, *Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control*. *Genetics*, 2011. **189**(4): p. 1177-1201.
202. Pierce, C.G., D.P. Thomas, and J.L. López-Ribot, *Effect of tunicamycin on Candida albicans biofilm formation and maintenance*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009. **63**(3): p. 473-479.
203. Pasligh, J., et al., *Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of Candida dubliniensis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2010. **43**(2): p. 147-154.
204. Ding, J., et al., *Tolerance and stress response to ethanol in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009. **85**(2): p. 253-263.
205. Martchenko, M., et al., *Transcriptional Rewiring of Fungal Galactose-Metabolism Circuitry*. *Current Biology*, 2007. **17**(12): p. 1007-1013.
206. Hall, R.A., et al., *CO₂ Acts as a Signalling Molecule in Populations of the Fungal Pathogen Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(11): p. e1001193.
207. Henriques, M., J. Azeredo, and R. Oliveira, *Candida albicans and Candida dubliniensis: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity*. *British journal of biomedical science*, 2006. **63**(1): p. 5-11.
208. Marcos-Zambrano, L.J., et al., *Production of biofilm by Candida and non-Candida spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and*

- development of cut-off points*. International Journal of Medical Microbiology, 2014. **304**(8): p. 1192-1198.
209. Owotade, F.J., et al., *Oral Candida colonization in HIV-positive women: associated factors and changes following antiretroviral therapy*. Journal of Medical Microbiology, 2013. **62**(1): p. 126-132.
210. Moyes, D.L., et al., *Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to Candida albicans and Candida dubliniensis hyphae*. Medical Microbiology and Immunology, 2012. **201**(1): p. 93-101.
211. Morgner, B., *Analyse eines tRNA-modifizierenden Enzyms unter virulenzassoziierten Bedingungen in Candida albicans*, in *HKI, Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen*. 2015, FSU Jena.
212. Böttcher, B., et al., *tRNA modifications: a novel virulence factor in the human pathogen Candida spp.*
213. Bai, C., et al., *MNN5 encodes an iron-regulated α -1, 2-mannosyltransferase important for protein glycosylation, cell wall integrity, morphogenesis, and virulence in Candida albicans*. Eukaryotic cell, 2006. **5**(2): p. 238-247.
214. Hall, R.A., et al., *The Mnn2 mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of Candida albicans*. PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003276.
215. Sinha, H., et al., *Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-temperature growth in yeast*. Genetics, 2008. **180**(3): p. 1661-1670.
216. Li, H. and A.D. Johnson, *Evolution of Transcription Networks — Lessons from Yeasts*. Current Biology, 2010. **20**(17): p. R746-R753.
217. Askew, C., et al., *Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000612.
218. Park, J., et al., *FTFD: an informatics pipeline supporting phylogenomic analysis of fungal transcription factors*. Bioinformatics, 2008. **24**(7): p. 1024-1025.
219. Zhao, H., et al., *Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(44): p. 28713-28720.
220. Wilson, D., *An evolutionary perspective on zinc uptake by human fungal pathogens*. Metallomics : integrated biometal science, 2015. **7**(6): p. 979-985.
221. Wu, C.-Y., et al., *Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genomics, 2008. **9**(1): p. 370.
222. Finkel, J.S. and A.P. Mitchell, *Genetic control of Candida albicans biofilm development*. Nature Reviews Microbiology, 2011. **9**(2): p. 109-118.
223. Bird, A., et al., *Mapping the DNA Binding Domain of the Zap1 Zinc-responsive Transcriptional Activator*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p. 16160-16166.
224. Herbig, A., et al., *Zap1 activation domain 1 and its role in controlling gene expression in response to cellular zinc status*. Molecular Microbiology, 2005. **57**(3): p. 834-846.
225. Citiulo, F., et al., *Candida albicans Scavenges Host Zinc via Pral during Endothelial Invasion*. PLoS Pathogens, 2012. **8**(6): p. e1002777.
226. Zhao, H. and D. Eide, *The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(6): p. 2454-2458.
227. Bird, A.J., et al., *The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2*. The EMBO Journal, 2004. **23**(5): p. 1123-1132.
228. Homann, O.R., et al., *A Phenotypic Profile of the Candida albicans Regulatory Network*. PLOS Genetics, 2009. **5**(12): p. e1000783.
229. de Oliveira Schneider, R., et al., *Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in Cryptococcus gattii*. PloS one, 2012. **7**(8): p. e43773.
230. Moreno, M.Á., et al., *The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for Aspergillus fumigatus virulence*. Molecular microbiology, 2007. **64**(5): p. 1182-1197.

231. Bashford, C.L., et al., *Cell damage by cytolysin. Spontaneous recovery and reversible inhibition by divalent cations*. The Journal of Immunology, 1988. **141**(11): p. 3965-3974.
232. Shoichi, I., et al., *Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocyte*. Molecular immunology, 1990. **27**(8): p. 803-807.
233. Hellwig, D., et al., *Candida albicans induces Metabolic Reprogramming in human NK cells and responds to Perforin with a Zinc Depletion Response*. Frontiers in microbiology, 2016. **7**.
234. Thévenin, A., et al., *Functional gene groups are concentrated within chromosomes, among chromosomes and in the nuclear space of the human genome*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(15): p. 9854-9861.
235. Hershberg, R., E. Yeger-Lotem, and H. Margalit, *Chromosomal organization is shaped by the transcription regulatory network*. Trends in Genetics, 2005. **21**(3): p. 138-142.
236. Kühn, C. and E. Klipp, *Zooming in on yeast osmoadaptation*, in *Advances in systems biology*. 2012, Springer. p. 293-310.
237. San Jose, C., et al., *The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus Candida albicans*. Journal of Bacteriology, 1996. **178**(19): p. 5850-5852.
238. Montañés, F.M., A. Pascual-Ahuir, and M. Proft, *Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors*. Molecular Microbiology, 2011. **79**(4): p. 1008-1023.
239. Pinjon, E., et al., *Azole susceptibility and resistance in Candida dubliniensis*. Biochemical Society Transactions, 2005. **33**(5): p. 1210-1214.
240. Marie, C., S. Leyde, and T.C. White, *Cytoplasmic localization of sterol transcription factors Upc2p and Ecm22p in S. cerevisiae*. Fungal Genetics and Biology, 2008. **45**(10): p. 1430-1438.
241. Bird, A.J., et al., *Zinc fingers can act as Zn²⁺ sensors to regulate transcriptional activation domain function*. The EMBO Journal, 2003. **22**(19): p. 5137-5146.
242. Harris, T.E. and J.C. Lawrence, *TOR Signaling*. Science's STKE, 2003. **2003**(212): p. re15-re15.
243. Kadosh, D. and J.L. Lopez-Ribot, *Candida albicans: Adapting to Succeed*. Cell host & microbe, 2013. **14**(5): p. 483-485.
244. Kojic, E.M. and R.O. Darouiche, *Candida infections of medical devices*. Clinical microbiology reviews, 2004. **17**(2): p. 255-267.
245. Jabra-Rizk, M.A., et al., *Effect of farnesol on Candida dubliniensis biofilm formation and fluconazole resistance*. FEMS Yeast Research, 2006. **6**(7): p. 1063-1073.
246. Nobile, C.J. and A.P. Mitchell, *Regulation of Cell-Surface Genes and Biofilm Formation by the C. albicans Transcription Factor Bcr1p*. Current Biology, 2005. **15**(12): p. 1150-1155.
247. López-Ribot, J.L., *Candida albicans Biofilms: More Than Filamentation*. Current Biology, 2005. **15**(12): p. R453-R455.
248. Rediers, H., et al., *Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. **69**(2): p. 217-261.
249. Jacobsen, I.D., et al., *Embryonated Eggs as an Alternative Infection Model To Investigate Aspergillus fumigatus Virulence*. Infection and Immunity, 2010. **78**(7): p. 2995-3006.
250. Zheng, J., et al., *Epistatic relationships reveal the functional organization of yeast transcription factors*. Molecular Systems Biology, 2010. **6**: p. 420-420.
251. López-Berges, M.S., et al., *A nitrogen response pathway regulates virulence functions in Fusarium oxysporum via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB*. The Plant Cell, 2010. **22**(7): p. 2459-2475.
252. Bastidas, R.J., J. Heitman, and M.E. Cardenas, *The Protein Kinase Tor1 Regulates Adhesin Gene Expression in Candida albicans*. PLOS Pathogens, 2009. **5**(2): p. e1000294.
253. Conrad, M., et al., *Nutrient sensing and signaling in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Fems Microbiology Reviews, 2014. **38**(2): p. 254-299.
254. Rocha, C.R., et al., *Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus Candida albicans*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): p. 3631-43.

255. Martin, R., et al., *The Candida albicans-Specific Gene EED1 Encodes a Key Regulator of Hyphal Extension*. PLOS ONE, 2011. **6**(4): p. e18394.
256. Maguire, S.L., et al., *Comparative Genome Analysis and Gene Finding in Candida Species Using CGOB*. Molecular Biology and Evolution, 2013.
257. Lu, Y., C. Su, and H. Liu, *A GATA Transcription Factor Recruits Hda1 in Response to Reduced Tor1 Signaling to Establish a Hyphal Chromatin State in Candida albicans*. PLoS Pathogens, 2012. **8**(4): p. e1002663.
258. Reiss, F. and G. Szilagyi, *Chlamydospore Formation of Candida albicans Comparative Studies on Special Media*. Dermatology, 1965. **131**(4): p. 315-324.
259. Campanha, N.H., et al., *Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between C. albicans and C. dubliniensis*. Oral Diseases, 2005. **11**(6): p. 392-398.
260. Navarathna, D.H., et al., *Candida albicans ISW2 Regulates Chlamydospore Suspensor Cell Formation and Virulence In Vivo in a Mouse Model of Disseminated Candidiasis*. PloS one, 2016. **11**(10): p. e0164449.
261. Chabasse, D., et al. *Candida albicans chlamydospores observed in vivo in a patient with AIDS*. in *Annales de biologie clinique*. 1988.
262. Tiago, F.d.C.P., et al., *Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics*. Journal of medical microbiology, 2012. **61**(9): p. 1194-1207.
263. Alicia, Z.-S., et al., *Rapid production of Candida albicans chlamydospores in liquid media under various incubation conditions*. 日本医真菌学会雑誌, 2006. **47**(3): p. 231-234.
264. Al-Hedaithy, S.S.A. and R. Fotedar, *Recovery and studies on chlamydospore-negative Candida albicans isolated from clinical specimens*. Medical Mycology, 2002. **40**(3): p. 301-306.
265. Simicevic, J., et al., *Absolute quantification of transcription factors during cellular differentiation using multiplexed targeted proteomics*. Nat Meth, 2013. **10**(6): p. 570-576.
266. Tebarth, B., et al., *Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in Candida albicans by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the EFG1 gene*. Journal of molecular biology, 2003. **329**(5): p. 949-962.
267. Palmer, G.E., et al., *Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in Candida albicans distinguish between growth and filamentation*. Microbiology, 2004. **150**(6): p. 1911-1924.
268. Liu, W., et al., *The protein kinase CaSch9p is required for the cell growth, filamentation and virulence in the human fungal pathogen Candida albicans*. FEMS yeast research, 2010. **10**(4): p. 462-470.
269. Mitchell, A.P., *Control of meiotic gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews, 1994. **58**(1): p. 56-70.
270. Zeidler, U., et al., *UME6 is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in Candida albicans*. FEMS Yeast Research, 2009. **9**(1): p. 126-142.
271. Jung, W.H. and L.I. Stateva, *The cAMP phosphodiesterase encoded by CaPDE2 is required for hyphal development in Candida albicans*. Microbiology, 2003. **149**(10): p. 2961-2976.
272. Al Mosaid, A., et al., *Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar*. Journal of clinical microbiology, 2001. **39**(1): p. 323-327.
273. Bharucha, N., et al., *A Large-Scale Complex Haploinsufficiency-Based Genetic Interaction Screen in Candida albicans: Analysis of the RAM Network during Morphogenesis*. PLOS Genetics, 2011. **7**(4): p. e1002058.
274. Chaffin, W.L., et al., *Cell Wall and Secreted Proteins of Candida albicans: Identification, Function, and Expression*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998. **62**(1): p. 130-180.
275. Gow, N.A.R. and B. Hube, *Importance of the Candida albicans cell wall during commensalism and infection*. Current Opinion in Microbiology, 2012. **15**(4): p. 406-412.
276. Netea, M.G., et al., *An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(1): p. 67-78.
277. Kadosh, D. and A.D. Johnson, *Induction of the Candida albicans filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(6): p. 2903-2912.

278. Uhl, M.A., et al., *Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen C. albicans*. The EMBO Journal, 2003. **22**(11): p. 2668-2678.
279. Ni, L. and M. Snyder, *A Genomic Study of the Bipolar Bud Site Selection Pattern in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(7): p. 2147-2170.
280. Ballou, E.R., et al., *Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion*. Nature Microbiology, 2016. **2**: p. 16238.
281. Grosjean, H. and E. Westhof, *An integrated, structure- and energy-based view of the genetic code*. Nucleic Acids Research, 2016. **44**(17): p. 8020-8040.
282. Hou, Y.-M., H. Gamper, and W. Yang, *Post-transcriptional modifications to tRNA—a response to the genetic code degeneracy*. RNA, 2015. **21**(4): p. 642-644.
283. d'Enfert, C. and B. Hube, *Candida: comparative and functional genomics*. 2007: Horizon Scientific Press.
284. Miranda, I., et al., *A Genetic Code Alteration Is a Phenotype Diversity Generator in the Human Pathogen Candida albicans*. PLoS ONE, 2007. **2**(10): p. e996.
285. Santos, M.A., V.M. Perreau, and M.F. Tuite, *Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in Candida albicans*. The EMBO Journal, 1996. **15**(18): p. 5060-5068.
286. Nedialkova, D.D. and S.A. Leidel, *Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1606-1618.
287. Chen, C., et al., *Unexpected Accumulation of ncm^5U and ncm^5s^2U in a *trm9* Mutant Suggests an Additional Step in the Synthesis of mcm^5U and mcm^5s^2U* . PLOS ONE, 2011. **6**(6): p. e20783.
288. Tuorto, F. and F. Lyko, *Genome recoding by tRNA modifications*. Open Biology, 2016. **6**(12): p. 160287.
289. Jüdes, A., et al., *Sulfur transfer and activation by ubiquitin-like modifier system Uba4•Urm1 link protein urmylation and tRNA thiolation in yeast*. Microbial Cell, 2016. **3**(11): p. 423-433.
290. Leidel, S., et al., *Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 228-232.
291. Leimkühler, S., M. Böhning, and L. Beilschmidt, *Shared Sulfur Mobilization Routes for tRNA Thiolation and Molybdenum Cofactor Biosynthesis in Prokaryotes and Eukaryotes*. Biomolecules, 2017. **7**(1): p. 5.
292. Jüdes, A., et al., *Urm1 and tRNA thiolation functions of ubiquitin-like Uba4•Urm1 systems are conserved from yeast to man*. FEBS Letters, 2015. **589**(8): p. 904-909.
293. Perrochia, L., et al., *In vitro biosynthesis of a universal t^6A tRNA modification in Archaea and Eukarya*. Nucleic Acids Research, 2012. **41**(3): p. 1953-1964.
294. Lin, C.A., S.R. Ellis, and H.L. True, *The Sua5 Protein Is Essential for Normal Translational Regulation in Yeast*. Molecular and Cellular Biology, 2010. **30**(1): p. 354-363.
295. Kimura, S., et al., *Discovery of the β -barrel-type RNA methyltransferase responsible for N6-methylation of N6-threonylcarbamoyladenine in tRNAs*. Nucleic acids research, 2014. **42**(14): p. 9350-9365.
296. Matuszewski, M., et al., *A hydantoin isoform of cyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ct^6A) is present in tRNAs*. Nucleic Acids Research, 2016: p. gkw1189.
297. Kang, B.-i., et al., *Identification of 2-methylthio cyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ms^2ct^6A) as a novel RNA modification at position 37 of tRNAs*. Nucleic Acids Research, 2016: p. gkw1120.
298. Thiaville, P.C., D. Iwata-Reuyl, and V. de Crécy-Lagard, *Diversity of the biosynthesis pathway for threonylcarbamoyladenine (t^6A), a universal modification of tRNA*. RNA biology, 2014. **11**(12): p. 1529-1539.
299. Finn, R.D., et al., *The Pfam protein families database: towards a more sustainable future*. Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D279-D285.
300. Globisch, D., et al., *Systems-Based Analysis of Modified tRNA Bases*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(41): p. 9739-9742.
301. Novoa, Eva M., et al., *A Role for tRNA Modifications in Genome Structure and Codon Usage*. Cell, 2012. **149**(1): p. 202-213.

302. Shively, C.A., et al., *Genetic networks inducing invasive growth in Saccharomyces cerevisiae identified through systematic genome-wide overexpression*. Genetics, 2013. **193**(4): p. 1297-1310.
303. Abdullah, U. and P.J. Cullen, *The tRNA modification complex elongator regulates the Cdc42-dependent mitogen-activated protein kinase pathway that controls filamentous growth in yeast*. Eukaryotic cell, 2009. **8**(9): p. 1362-1372.
304. Noon, K.R., et al., *Influence of temperature on tRNA modification in archaea: Methanococcoides burtonii (optimum growth temperature [Topt], 23 C) and Stetteria hydrogenophila (Topt, 95 C)*. Journal of bacteriology, 2003. **185**(18): p. 5483-5490.
305. Kinghorn, S.M., et al., *Physiological analysis of the role of truB in Escherichia coli: a role for tRNA modification in extreme temperature resistance*. Microbiology, 2002. **148**(11): p. 3511-3520.
306. Alings, F., et al., *An evolutionary approach uncovers a diverse response of tRNA 2-thiolation to elevated temperatures in yeast*. RNA, 2015. **21**(2): p. 202-212.
307. Esberg, A., et al., *Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for elongator complex in transcription and exocytosis*. Molecular cell, 2006. **24**(1): p. 139-148.
308. Klassen, R., A. Bruch, and R. Schaffrath, *Independent suppression of ribosomal +1 frameshifts by different tRNA anticodon loop modifications*. RNA Biology, 2016: p. 00-00.
309. Klassen, R., et al., *tRNA anticodon loop modifications ensure protein homeostasis and cell morphogenesis in yeast*. Nucleic Acids Research, 2016. **44**(22): p. 10946-10959.
310. Wimalasena, T.T., et al., *Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of Candida albicans*. Fungal Genetics and Biology, 2008. **45**(9): p. 1235-1247.
311. Ramírez, M.A. and M.C. Lorenz, *Mutations in alternative carbon utilization pathways in Candida albicans attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes*. Eukaryotic cell, 2007. **6**(2): p. 280-290.
312. Elf, J., et al., *Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage*. Science, 2003. **300**(5626): p. 1718-1722.
313. Powers, R.W., et al., *Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling*. Genes & development, 2006. **20**(2): p. 174-184.
314. Zinshteyn, B. and W.V. Gilbert, *Loss of a conserved tRNA anticodon modification perturbs cellular signaling*. PLoS Genet, 2013. **9**(8): p. e1003675.
315. Wei, F.-Y., et al., *Deficit of tRNA Lys modification by Cdk11 causes the development of type 2 diabetes in mice*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(9): p. 3598-3608.
316. Blagosklonny, M., *TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists*. Cell death & disease, 2013. **4**(12): p. e964.
317. Schröder, M., J.S. Chang, and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast*. Genes & Development, 2000. **14**(23): p. 2962-2975.
318. Rojas-Benítez, D., C. Ibar, and Á. Glavic, *The Drosophila EKC/KEOPS complex: Roles in protein synthesis homeostasis and animal growth*. Fly, 2013. **7**(3): p. 168-172.
319. French, C.T., et al., *Large-scale transposon mutagenesis of Mycoplasma pulmonis*. Molecular microbiology, 2008. **69**(1): p. 67-76.
320. Langridge, G.C., et al., *Simultaneous assay of every Salmonella Typhi gene using one million transposon mutants*. Genome research, 2009. **19**(12): p. 2308-2316.
321. Chaudhuri, R.R., et al., *Comprehensive identification of essential Staphylococcus aureus genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH)*. BMC genomics, 2009. **10**(1): p. 291.
322. Jin, R., et al., *Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression*. Molecular biology of the cell, 2008. **19**(1): p. 284-296.
323. Takano, Y., et al., *A gene involved in modifying transfer RNA is required for fungal pathogenicity and stress tolerance of Colletotrichum lagenarium*. Molecular microbiology, 2006. **60**(1): p. 81-92.

Literaturverzeichnis

324. Shippy, D.C., et al., *Virulence characteristics of Salmonella following deletion of genes encoding the tRNA modification enzymes GidA and MnmE*. *Microbial pathogenesis*, 2013. **57**: p. 1-9.

9 Anhang

9.1 Zusätzliche Abbildungen

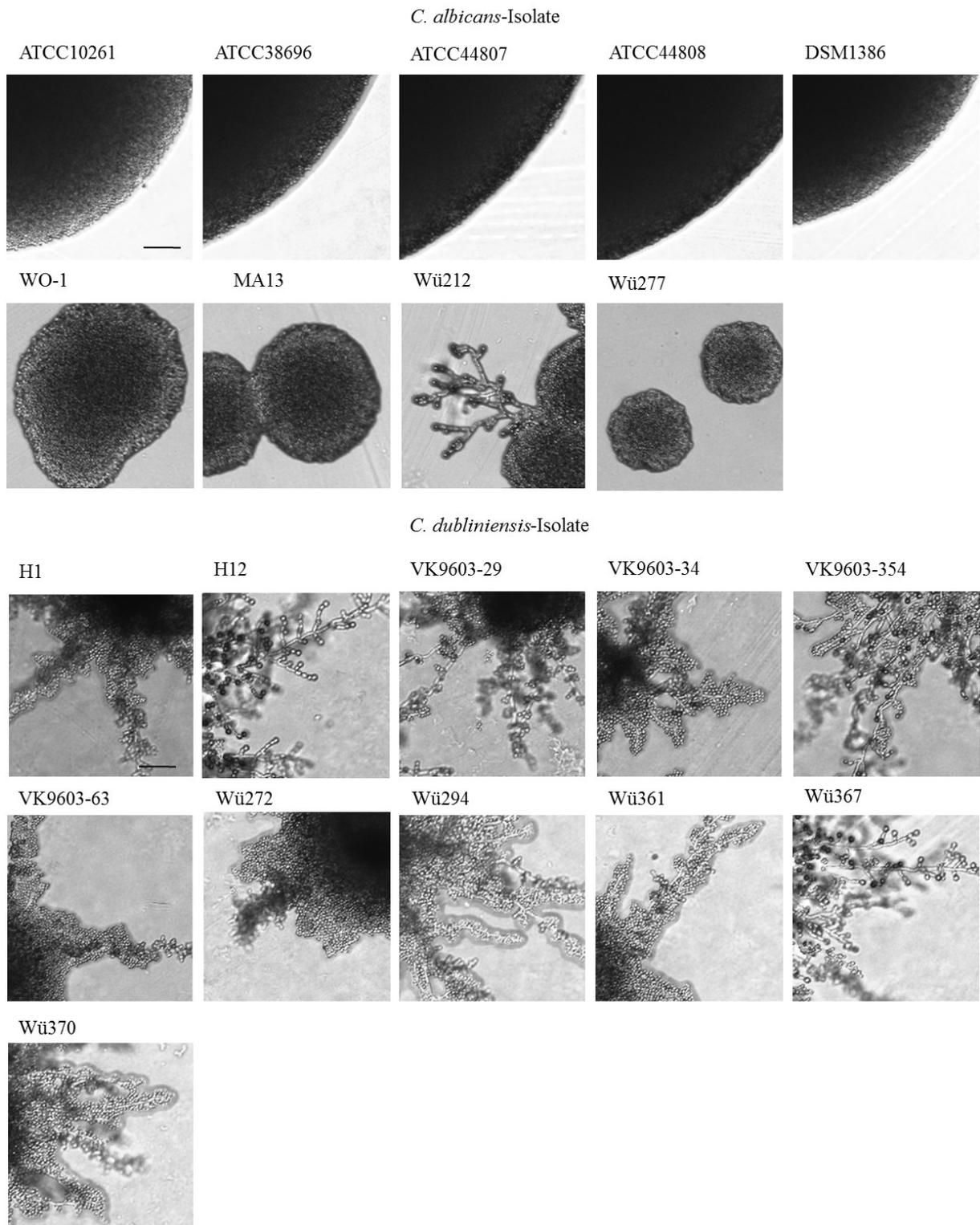


Abbildung 17 Koloniemorphologie von *C. albicans* und *C. dubliniensis*-Isolaten [179]. Die Stämme *C. albicans* ATCC10261, ATCC38696, ATCC44807, ATCC44808, DSM1386, WO-1, MA13, Wü212, Wü277 und *C. dubliniensis* H1, H12, VK9603-29, VK9603-34, VK9603-354, VK9603-63, Wü272, Wü294, Wü361, Wü367, Wü370 wurden auf SLAD-Agar für 48 h bei 30 °C inkubiert und mikroskopisch analysiert. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 50 µM.

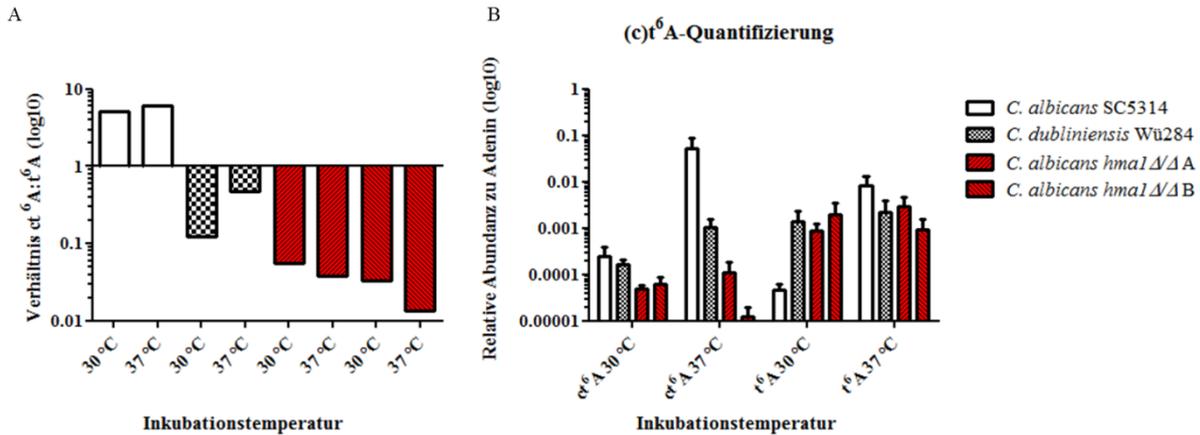


Abbildung 18 Quantitative Analysen von tRNA-Adenosinmodifikationen per Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung in *Candida* spp. Die Zellen der Stämme *C. albicans* SC5314 und *hma1Δ/Δ*-Deletionsmutanten sowie *C. dubliniensis* Wü284 wurden für 4h in YPD bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Nach der Isolation der totalen RNA [5] wurden die ct^6A - und t^6A -tRNA-Modifikationen in der Arbeitsgruppe Leidel (MPI, Münster) standardisiert quantifiziert [306]. Die Messwerte wurden (A) als relative Menge in technischen Replikaten zu der Adenosinmenge der tRNA-Proben dargestellt, wobei sich nach Inkubation bei 37 °C die Menge an modifizierten gegenüber den unmodifizierten Adeninbasen erhöhte. Die Messwerte wurden in (B) als Verhältnis der zyklischen (ct^6A) gegenüber der hydrolysierten (t^6A) Form abgebildet. Eine signifikante Reduktion von ct^6A wurde in Hma1-defizienten *C. albicans*-Stämmen gemessen. Zudem unterschied sich das Muster der Basenmodifikationen zwischen den Wildtypen von *C. albicans* und *C. dubliniensis*.

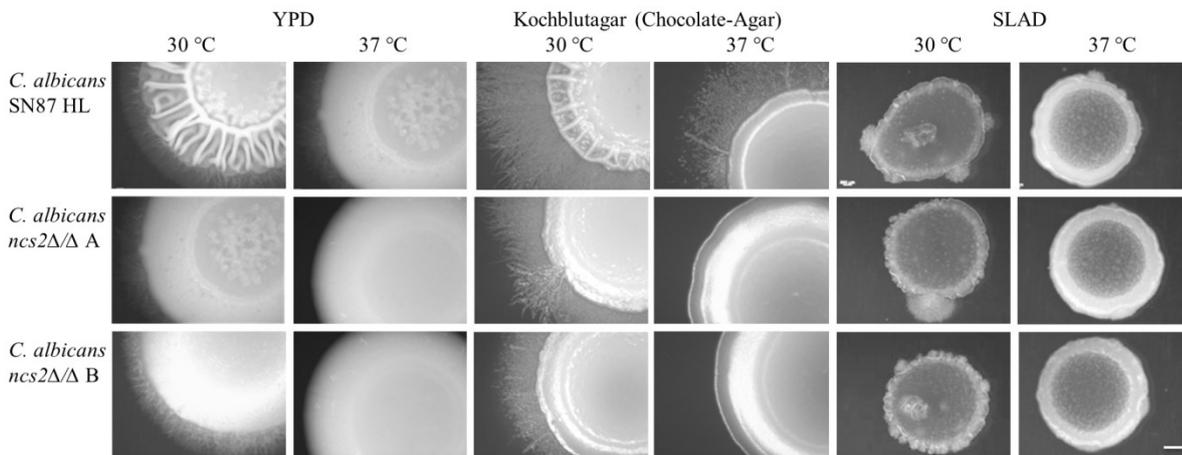


Abbildung 19 Koloniemorphologie der *C. albicans*-Stämme SN87HL und *ncs2Δ/Δ*. Der Patentstamm SN87HL und die *ncs2Δ/Δ*-Mutanten wurden für 7 d auf YPD-, Kochblut- oder SLAD-Agar bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert und die makroskopische Morphologie wurde mittels Binokular (Stemi 2000-C, Carl Zeiss Microscopy GmbH) begutachtet. Die Deletionsmutanten zeigten auf nährstoffreichen Medien Filamentierungsdefekte, die bei 37 °C besonders ausgeprägt waren. Der Maßstabsbalken entspricht 1 cm.

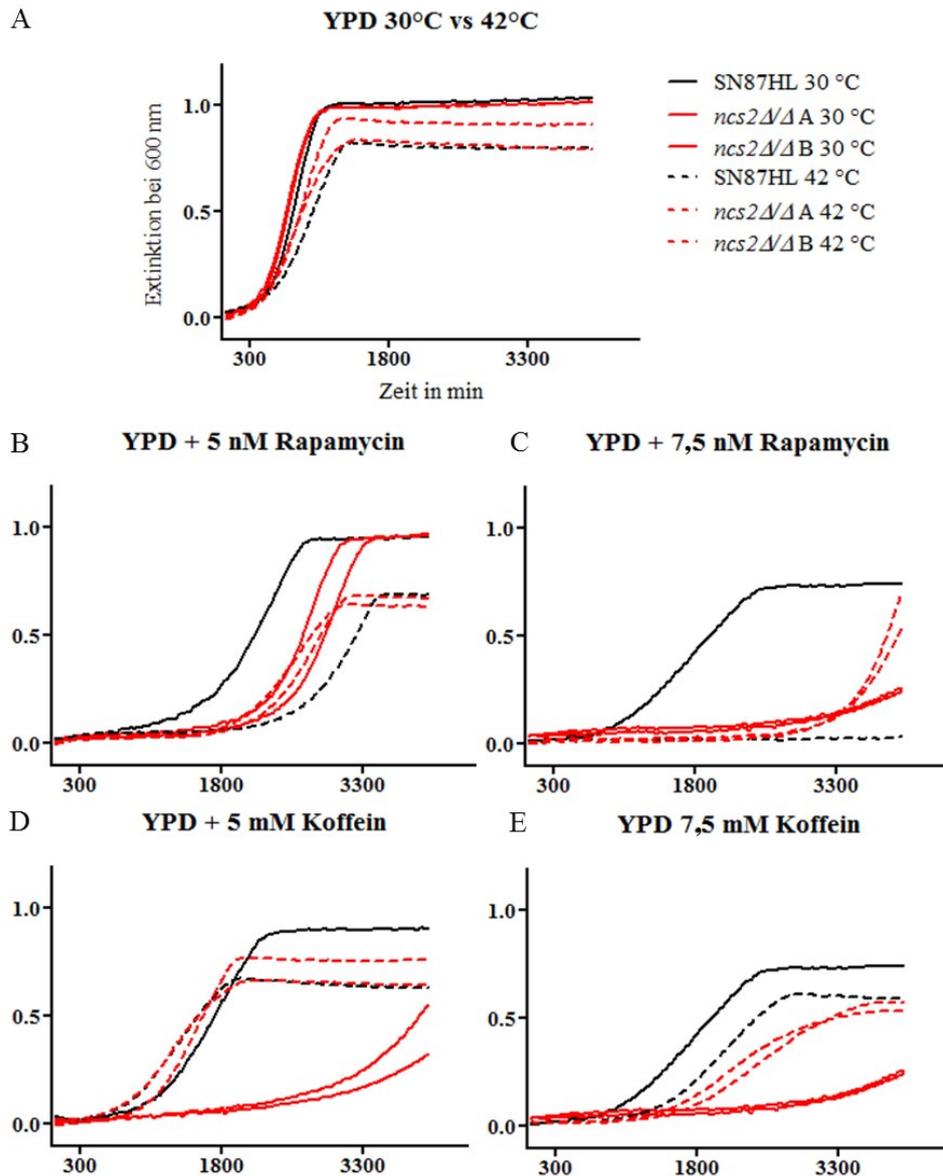


Abbildung 20 Wachstumskurven der Stämme *C. albicans* SN87HL und *ncs2Δ/Δ*-Deletionsmutanten. Die Kontrollstämme wurden schwarz und die Mutanten in Rot dargestellt, wobei eine Inkubationstemperatur von 30 °C als eine durchgängige Linie und die 42 °C als gestrichelte Linie gegenüber gestellt wurden. Das Zellwachstum wurde als Veränderung der optischen Dichte über die Zeit in (A) YPD-Vollmedium oder unter Zusatz von (B, C) Rapamycin bzw. (D, E) Koffein analysiert. Die Resistenzen gegenüber den TOR-Antagonisten waren abhängig von der Inkubationstemperatur.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 12 Abkürzungsverzeichnis

Akronym	Beschreibung
ALS	Agglutinin-ähnliche Sequenz, Englisch: agglutinin-like sequence
ASL	Anticodonschleife, Englisch: anticodon stem loop
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Bioinformatisches Programm zum Sequenzvergleich, Englisch: Basic Local Alignment Search Tool

Ca	<i>Candida albicans</i> als Präfix vor Gen- oder Proteinbezeichnungen
CAM	Eine aus Chorion und Allantois gebildete Membran, Englisch: chorio-allantoic membrane
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cd	<i>Candida dubliniensis</i> als Präfix vor Gen- oder Proteinbezeichnungen
c-Fos	Humanes Protoonkogen
CM	Maismehl, Englisch: corn meal
Ct	Schwellenwert der Fluoreszenz, Englisch: cycle threshold
(c)t ⁶ A	(zyklisches) Threonylcarbamoyladenoin, Englisch: (cyclic) threonylcarbamoyladenoin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Zellkulturmedium, Englisch: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Englisch: deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
ELP	Elongator Protein Komplex
FBS	Fetales Kälberserum, Englisch: fetal bovine serum
FK506	Tacrolimus (Makrolidlacton)
FKBP-12	FK506-bindendes Protein (Immunsuppressivum)
FRB	Rapamycin-bindende Domäne von FKBP-12, Englisch: FKBP12-rapamycin binding
FRT	Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase, Englisch: Flp recombination target
GAAC	Kontrolle der Aminosäurebiosynthese, Englisch: general amino acid control
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus, Englisch: human immunodeficiency virus
HOG	Signalweg der osmotischen Stressantwort, Englisch: High Osmolarity Glycerol response
IL	Interleukin
Kb	Kilobasenpaare
KEOPS	Proteinkomplex der t ⁶ A-Synthese, Englisch: Endopeptidase-like Kinase Chromatin-associated protein complex
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, Englisch: Liquid chromatography–mass spectrometry
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LZM	Zinklimitiertes Medium, endständige Ziffern geben die zugegebene Zinkkonzentration (ZnSO ₄ in µM) an, Englisch: low zinc medium
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase, Englisch: mitogen-activated protein (MAP) kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, Englisch: mitogen-activated protein kinase kinase
Mb	Megabasenpaare
MKP1	Protein-Tyrosin-Phosphatase

MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-RNA, Englisch: messenger RNA
NCR	Repression des Stickstoffkatabolismus, Englisch: nitrogen catabolite repression
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen, Englisch: open reading frame
pi	Nach der Infektion, Englisch: postinfection
PBLAST	Protein BLAST, bioinformatische Methode zum Vergleich von Aminosäuresequenzen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, Englisch: phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, Englisch: polymerase chain reaction,
PFAM	Datenbank zur Kategorisierung von Proteindomänen, Englisch: protein families
PKA	Proteinkinase A
rpm	Umdrehungen pro Minute, Englisch: revolutions per minute
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RHE	Rekonstruiertes humanes Epithel
RNA	Ribonukleinsäure, Englisch: Ribonucleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, Englisch: reactive oxygen species
rRNA	Ribosomale RNA
SAP	sekretorische Aspartat-Protease
SD	Synthetisches Minimalmedium, Englisch: synthetic defined medium
SDS	Natriumdodecylsulfat, Englisch: sodium dodecyl sulfate
SLAD	Synthetisches, stickstofflimitiertes Minimalmedium, Englisch: synthetic low-ammonium dextrose
Spp.	Arten, Englisch: Species
U	Enzymeinheit, Englisch: enzyme unit
ThiF	Adenyltransferase der Thiamin-Biosynthese
TLO	Gene der Telomerregionen, Englisch: telomeric open reading frame
TOR	Kinasekomplex und Zielstruktur von Rapamycin, Englisch: Target Of Rapamycin
tRNA	Transfer-RNA
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine, Englisch: Unfolded Protein Response
UTR	Untranslatierter Bereich, Englisch: UnTranslated Region
WT	Wildtyp, wildtypisch
YNB	Synthetisches Minimalmedium, Englisch: Yeast Nitrogen Base
YP	Vollmedium ohne Glucose, Englisch: Yeast extract Peptone
YPD	Vollmedium, Englisch: Yeast extract Peptone Dextrose
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz
ZCF	Zinkfingertranskriptionsfaktor, Englisch: zinc finger transcription factor
ZRE	Genetisches Sequenzmotiv von Genen der Zinkhomöostase, Englisch: Zinc Responsive Elements

9.3 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt. Personen, die mich bei den Experimenten, der Datenanalyse und der Verfassung der Manuskripte unterstützt haben, sind als Ko-Autoren auf den entsprechenden Manuskripten verzeichnet. Personen die mich bei der Verfassung der Dissertation unterstützt haben, sind in der Danksagung der Dissertation vermerkt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht und auch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung verwendet.

Jena, 11. Mai 2018

Bettina Böttcher

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich während der Promotion begleitet und unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Prof. Bernhard Hube, der mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit in seinem Labor anzufertigen. Ich danke ihm für die ausgesprochen gute Betreuung, seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, dem entgegengebrachten Vertrauen und für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Peter Staib für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Forschungsthemas und seine intensive Betreuung zu Beginn der Promotion bedanken.

Außerdem danke ich allen Gutachtern für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation.

Einen außerordentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit hat mein Betreuer Dr. Sascha O. Brunke durch seine allgegenwärtige Diskussionsbereitschaft, sein unermüdliches Korrekturlesen und seine kreativen Lösungsstrategien beigetragen, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Für eine exzellente wissenschaftliche Zusammenarbeit, Probenanalysen bzw. der Bereitstellung von *Candida*-Stämmen möchte ich den KooperationspartnerInnen der Forschungsgruppe RNA Biologie von Dr. Sebastian Leidel am MPI Münster und Prof. Joachim Morschhäuser vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie Würzburg danken.

Ich möchte mich bei allen MitarbeiterInnen der HKI-Forschungsgruppen MPM, MI, MPP und HFI für eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und eine freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Besondere Unterstützung habe ich von Prof. Ilse D. Jacobsen während der Infektionsversuche und Dr. Ekaterina Shelest bei *in silico*-Analysen erfahren. Hervorheben möchte ich zudem die großartigen Arbeiten von Christine Pöllath und Bianka Morgner, die im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten das Projekt maßgeblich vorangetrieben haben. Bei Dr. Slavena Vylkova möchte ich mich für die zugestandene Zeit zur Fertigstellung der Dissertation bedanken. Des Weiteren danke ich allen technischen und studentischen AssistentInnen für viele helfende Hände, Volha, Philipp, Antje und Katja für ausdauernde fachliche Diskussionen sowie Dr. Christin Leitzinger für ihr kritisch-konstruktives Korrekturlesen.

Zu guter Letzt danke ich sehr herzlich meiner Familie für jegliche Unterstützung und ihren immerwährenden Rückhalt als auch allen FreundInnen und meinen persönlichen „Pacemakern“ für ihre unablässige und nicht ersetzbare Begleitung auf diesem Weg.

9.5 Übersicht über Konferenzbeiträge, weitere Publikationen und Preise

9.5.1 Vorträge

- Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2016, Jena, tRNA modifications: a novel virulence factor in pathogenic *Candida* species
- Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2013, Rostock, “Identification of species-specific genes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*”

9.5.2 Posterpräsentationen

- Advanced Lecture Course (HFP: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions and virulence in human fungal pathogens) 2017, La Colle sur Loup, Modifications of transfer RNAs represent an epigenetic link to virulence traits in *Candida* species.
- American Society for Microbiology (ASM) Conference on Candida and Candidiasis 2016, Seattle, Modification of tRNA bases as virulence factor in pathogenic *Candida* species
- Deutsche Mykologische Gesellschaft (DMyKG) 2015, Jena, tRNA modifications: an underestimated pathway to regulate morphology and pathogenicity-associated features in *Candida* species
- American Society for Microbiology (ASM) Conference on Candida and Candidiasis 2014, New Orleans Molecular cross-species approaches to elucidate virulence-related traits of *Candida albicans*
- Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2012, Hamburg, “Identification of virulence related genes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by comparative genetic analysis.“

9.5.3 Weitere Publikationen

- Florian Henicke, Maria Grumbt, Ulrich Lermann, Nico Ueberschaar, Katja Palige, **Bettina Böttcher**, Ilse D. Jacobsen, Claudia Staib, Joachim Morschhäuser, Michel Monod, Bernhard Hube, Christian Hertweck und Peter Staib; Factors Supporting Cysteine Tolerance and Sulfite Production in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 2013. 12(4): p. 604-613.

9.5.4 Preise

- Zweiter Preis der Photographiewettbewerbs der 50. DMyKG Konferenz 2016, Titel: Mitotracker-stained chlamydo spores by *Candida dubliniensis*
- Hans-Rieth-Poster Award, DMyKG Konferenz 2015