Biochemische und genetische Untersuchungen des Transkriptionsregulators Efg1 aus *Candida albicans*

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Dagmar Sabine Kurtz
aus Oppeln

Düsseldorf, November 2010

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

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2010

1. Einleitung....1
1.1 Pilze.... 1
1.2 Molekularbiologisches Arbeiten mit *C. albicans*....2
1.3 Der humanpathogene Pilz *C. albicans* und seine Virulenzfaktoren....3
1.4 Regulation des Dimorphismus.... 6
1.5 Der Transkriptionsfaktor Efg1.... 8
1.6 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen....13
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit....16
2. Material und Methoden.... 17
2.1 Chemikalien und Enzyme.... 17
2.2 Stämme....18
2.2.1 *E. coli*-Stämme.... 18
2.2.2 *C. albicans*-Stämme.... 18
2.2.3 *S. cerevisiae*-Stämme....19
2.3 Medien.... 20
2.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli* 20
2.3.2 Medien zur Anzucht von Hefen.... 20
2.3.3 Hypheninduktion bei *C. albicans* auf festen Medien.... 21
2.3.4 Hypheninduktion bei *C. albicans* in flüssigem Medium.... 21
2.3.5 Induktion von Chlamydosporen in *C. albicans*.... 21
2.3.6 Inkubation von *C. albicans* unter hypoxischen Bedingungen.... 21
2.4 Plasmide und Primer.... 22
2.4.1 Plasmide.... 22
2.4.2 Primer.... 23
2.5 Molekularbiologische Methoden.... 25
2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.... 25
2.5.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*.... 25
2.5.3 DNA-Sequenzierung.... 25
2.5.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese.... 26
2.5.5 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren....26
2.5.5.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.... 26
2.5.5.2 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel.... 26
2.5.6 Aufreinigung von PCR-Produkten.... 26
2.5.7 Restriktionsverdau.... 27
2.5.8 Ligation.... 27
2.5.9 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.... 27
2.5.10 Radioaktive Markierung von DNA.... 27
2.5.11 Molekulargewichts- und Größenstandards.... 28
2.5.11.1 DNA-Größenstandard.... 28
2.5.11.2 Protein-Größenstandard.... 28
2.5.12 Calcofluor White-Färbung.... 28
2.5.13 Mikroskopische Untersuchungen....28
2.5.14 Transformation....29
2.5.14.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (RbCl-Methode).... 29

2.5.14.2 Transformation von *E. coli*-Zellen..... 29
2.5.14.3 *C. albicans*-Schnelltransformation..... 30
2.5.14.4 Transformation von *C. albicans* –Zellen nach Mitchell (2000).....30
2.5.14.5 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen.....30
2.5.15 Polymerasekettenreaktion (PCR).....31
2.5.15.1 Standard-PCR.....31
2.5.15.2 Mutagenese-PCR.....32
2.5.15.3 Kolonie-PCR.....32
2.6 Biochemische Methoden..... 33
2.6.1 Zellaufschluss zur Herstellung von Proteinrohextrakten..... 33
2.6.1.1 Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle..... 33
2.6.1.2 Zellaufschluss durch Ultraschall..... 33
2.6.1.3 Zellaufschluss durch FastPrep Gerät..... 34
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford..... 34
2.6.3 Bestimmung der β–Galaktosidase-Aktivität..... 34
2.6.3.1 X-Gal-Overlay Assay..... 34
2.6.3.2 β–Galaktosidase Flüssigtest..... 35
2.6.4 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen über Phosphatase-Behandlung..... 35
2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... 36
2.6.6 Coomassie-Färbung von Proteingelen..... 36
2.6.7 Silberfärbung für Proteingele..... 36
2.6.8 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse..... 37
2.6.9 Gelretardierungsexperimente..... 37
2.6.10 Vernetzung von Proteinen mit dem BS^3-Crosslinker..... 38
2.6.11 Immunpräzipitation..... 38
2.6.12 Gelfiltrationschromatographie von Proteinen..... 39
2.6.13 Reinigung durch Metallaffinitätschromatographie (IMAC)..... 40
2.6.13.1 Reinigung des Efg1-Proteins aus *E. coli*..... 41
2.6.13.2 Reinigung des Efg1-Proteins aus *C. albicans*..... 42
3. Ergebnisse..... 43
3.1 Reinigung von Efg1..... 43
3.1.1 Reinigung von Efg1 aus *E. coli*..... 43
3.1.1.1 Expressionsplasmid.....43
3.1.1.2 Reinigung von Efg1..... 44
3.1.1.3 Anpassung des *E. coli*-Expressionsplasmids an den Kodongebrauch von *C. albicans*..... 46
3.1.1.4 Erhöhung der Proteinstabilität durch Puffer-Optimierung..... 46
3.1.1.5 Erhöhung der Proteinausbeute durch Verwendung von *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS.....49
3.1.2 Reinigung von Efg1 aus *S. cerevisiae*..... 50
3.1.2.1 Expressionsplasmid.....50
3.1.2.2 Reinigung von Efg1..... 52
3.1.3 Reinigung von Efg1 aus *C. albicans*..... 52
3.1.3.1 Expressionsplasmid..... 53

3.1.3.2 Reinigung von Efg1 53
3.2 Herstellung eines polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums 55
3.2.1 Immunisierung und Serumgewinnung 55
3.2.2 Antiserum-Analyse mittels ELISA 56
3.2.3 Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums 57
3.2.4 Immunpräzipitation 60
3.3 Gelfiltrationschromatographie zur Analyse der molekularen Masse von Efg1 61
3.3.1 Eichung der Gelfiltrationssäule 62
3.3.2 Gelfiltrationschromatographie zur Ermittlung der molekularen Masse von Efg1 64
3.3.3 Vernetzung von Efg1 durch einen „Crosslinker“ 66
3.4 Posttranslationale Modifikation von Efg1 67
3.4.1 Phosphorylierung von Efg1 68
3.4.2 Posttranslationale Modifikation von Efg1 nach Hypheninduktion 69
3.4.3 Posttranslationale Modifikation von Efg1-Deletionsvarianten 72
3.4.4 Posttranslationale Modifikation von Efg1 unter hypoxischen Wachstumsbedingungen 74
3.4.5 Einfluss von Aminosäureaustauschen auf die posttranslationale Modifikation 74
3.5 Bedeutung des Cystein 218 für die Funktion von Efg1 76
3.5.1 Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung bei Normoxia 78
3.5.2 Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung bei Hypoxie 81
3.5.3 Einfluss des Cystein-Austausches auf die Chlamydosporenbildung 82
3.6 Untersuchungen zur DNA-Bindespezifität von Efg1 83
3.6.1 Bindung von Efg1 aus *C. albicans* Rohextrakten an ein 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors 84
3.6.2 Bindung von Efg1 an das APSES response element (ARE) in *S. cerevisiae* 86
3.6.3 Bindung von gereinigtem Efg1 aus *C. albicans* an Varianten des 408 bp-Fragments des *EFG1*-Promotors 89

4. Diskussion 91

4.1 Expression des *EFG1*-Gens und Reinigung von Efg1 92
4.2 Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums 94
4.3 Dimerisierung von Efg1 95
4.4 Efg1 ist mehrfach phosphoryliert 98
4.5 Einfluss des singulären Cys218-Restes und der Epitopmarkierung auf die Funktion von Efg1 100
4.6 Regulation von Efg1 über Bindung des ARE-Motivs 103

5. Zusammenfassung 105

6. Summary 106

7. Literaturverzeichnis 107

8. Abkürzungsverzeichnis 120

9. Anhang 123

1 Einleitung

1.1 Pilze

Pilze beeinflussen das Leben des Menschen seit jeher auf positive als auch auf negative Weise. So werden Pilze zur Herstellung von Lebensmitteln wie Brot, Käse, Wein und Bier genutzt. Aber auch in der Biotechnologie werden sie als Biofermenter für die Produktion von Nahrungsergänzungsmitteln wie Vitamin C, von Waschmittelenzymen, Futtermitteladditiven oder von organischen Säuren eingesetzt. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts kommen sie auch in der Medizin als Antibiotika- oder Impfstoffproduzenten zum Einsatz.

Neben diesen positiven Effekten können Pilze allerdings auch eine Bedrohung für den Menschen darstellen. So gehören zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen die Vertreter *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus*. Die *Candida* Gattung ist dabei für mindestens 80 % aller humanen Mykosen in Deutschland verantwortlich (Pfaller, 1996). *C. albicans* besiedelt als Kommensale den Gastrointestinal- und Oraltrakt eines gesunden Menschen. In neuesten Studien zur Untersuchung pilzlicher Komponenten der menschlichen Mundflora konnten *Candida*-Arten mit einem prozentualen Anteil von 75 % am häufigsten isoliert werden, gefolgt von *Cladosporium* (65 %), *Aureobasidium*, *Saccharomycetales* (jeweils 50 %), *Aspergillus* (35 %), *Fusarium* (30 %), und *Cryptococcus* (20 %) (Ghannoum *et al*., 2010). Als opportunistischer Erreger ist *C. albicans* für gesunde Menschen ungefährlich und wird mit Hilfe der zellulären und der humoralen Immunabwehr in Schach gehalten und verursacht lediglich lokal begrenzte Candidosen. Kommt es jedoch zu einer Schwächung des Immunsystems, so können systemische Infektionen auftreten, die in mehr als 50 % der Fälle tödlich verlaufen (Wey *et al.*, 1988). Zudem ist *Candida* auch in der Lage Biofilme auszubilden. Ein Biofilm ist eine komplexe dreidimensionale Architektur, die aus einem dichten Netz von Mikroorganismen besteht, welche von einer Matrix eingekapselt sind. Das Vorkommen von *Candida* Biofilmen auf Zelloberflächen oder auf implantierten Materialen wie z. B. auf Herzkathetern stellt somit einen wichtigen Aspekt der Pathogenität von *C. albicans* dar (Chandra *et al*., 2001; Kumamoto und Vinces, 2005).

Auch in Zukunft wird sich die klinische Relevanz von *C. albicans* weiter erhöhen, da heutzutage auf Grund des medizinischen Fortschritts die Anzahl an immunsupprimierten Menschen stark zunimmt. Dies ist vor allem bedingt durch Krankheiten wie AIDS und den Einsatz von Chemotherapeutika oder Immunsuppresiva bei Organverpflanzungen. Daher stellt die Erforschung und Entwicklung neuer Antimykotika ein zentrales Ziel der Wissenschaft dar. Als problematisch erweist sich dabei die Zugehörigkeit von Pilzen und Menschen zu der Gruppe der Eukaryonten. Auf Grund der molekularbiologischen Ähnlichkeit ist es schwierig Antimykotika zu finden, die selektiv pilzspezifische Komponenten angreifen und somit eine

effektive und nebenwirkungsarme Therapie ermöglichen. Die meisten der bekannten Antimykotika wirken auf das Wachstum oder Stoffwechselprozesse der Pilze ein. Polyen-Antimykotika (z. B. Amphotericin B, Nystatin) sind sogenannte Porenbildner, die zu einer Permeabilisierung der Membran und damit zu einem Verlust an Zellbestandteilen führen. Azol-Antimykotika (z. B. Fluconazol, Clotrimazol) hingegen beeinflussen die Ergosterol-Biosynthese. Bei Ergosterol handelt es sich um einen essentiellen Bestandteil der Cytoplasmamembran. Aber auch Bestandteile der Zellwand können einen Angriffspunkt für Antimykotika darstellen. Caspofungin, ein Fermentationsprodukt von *Glarea lozoyensis*, gehört zu der Gruppe der Echinocandine und hemmt die β(1,3)-Glukan-Synthase, die für den Aufbau des Zellwandbestandteils β(1,3)-Glukan essentiell ist. Als einziger Wirkstoff der zu einer Hemmung der DNA-Synthese führt, kommt Flucytosin (5-Fluorcytosin) zum Einsatz.

1.2 Molekularbiologisches Arbeiten mit *C. albicans*

Die Sequenzierung des kompletten *C. albicans* Genoms stellt ein wichtiges Hilfsmittel für die Arbeit mit diesem Organismus dar (http://www.candidagenome.org/) (d'Enfert *et al*., 2005). So konnten bereits mit Hilfe der DNA-Microarray-Technologie genomweite Transkriptom-Analysen durchgeführt werden (Doedt, 2003; Setiadi, 2006; Stichternoth, 2009; Garaizar *et al*., 2006; Sandovsky-Losica *et al*., 2006).

Ein Problem in der molekularbiologischen Arbeit mit *C. albicans* ergibt sich aus einem ungewöhnlichen Kodongebrauch. So übersetzt *C. albicans* das Basentriplett CUG in Serin und nicht in Leucin wie es normalerweise in der Proteinbiosynthese üblich ist (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995). Diese Tatsache muss vor allem bei dem Einsatz von heterologen Reportergenen beachtet werden. Ein Beispiel für ein in *C. albicans* verwendetes Reportergen, welches kein CUG-Kodon besitzt, ist das Luziferase Gen *RLUC* aus der Seegurke *Renilla reniformis* (Srikantha *et al*., 1996). Hierbei erfolgt der Nachweis der Genexpression durch Lumineszenz. Mit dem *lacZ* Reportergen aus *Streptococcus thermophilu*s oder dem *LAC4*-Gen aus der Hefe *Kluyveromyces lactis,* welche beide für das Enzym β-Galaktosidase kodieren, stehen weitere Reportergene zur Verfügung (Leuker *et al.*, 1992; Uhl und Johnson *et al.*, 2001). Das GFP-Gen aus der Qualle *Aequorea victoria* musste zunächst dem veränderten Kodongebrauch von *C. albicans* angepasst werden (Cormack *et al.*, 1997). Ein Nachteil der genannten Reportergene ist jedoch, dass sie nur in einer areoben Umgebung funktionsfähig sind, da die Chromophore Sauerstoff zur Assemblierung benötigen. *C. albicans* besiedelt jedoch unterschiedliche Nischen des menschlichen Körpers und ist dabei auch geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Vor kurzem konnte ein dem *Candida* Kodongebrauch angepasstes Reportergen (CaFbFP) entwickelt werden, welches sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen fluoresziert (Tielker *et al*., 2009).

Bei *C. albicans* handelt es sich um einen diploiden Organismus dessen Genom auf zweimal 8 Chromosomen angeordnet ist. Der Größe nach wurden diese entsprechend von 1

bis 7 durchnummeriert. Da die beiden größten Chromosomen die kodierende Sequenz der rRNA Gene beinhalten, erhielten sie die Bezeichnung R. Ein haploider Chromosomensatz hat dabei eine Größe von 15,5 Megabasenpaaren (Doi *et al.*, 1992). Aus dieser Diploidie von *C. albicans* ergibt sich die Schwierigkeit, dass zu Mutationsanalysen beide Allele eines Gens deletiert werden müssen, da es ansonsten zu Kompensationseffekten durch das zweite Allel kommt. Zur Gendisruption werden unter anderem die „URA-Blaster"-Methode, die „URA-Flipper"-Methode oder durch PCR-generierte Disruptionsfragmente genutzt (Fonzi und Irwin, 1993; Morschhäuser *et al*., 1999; Wilson *et al.*, 1999 und 2000).

1.3 Der humanpathogene Pilz *C. albicans* und seine Virulenzfaktoren

Der humanpathogene Pilz *C. albicans* zählt zum Stamm der Ascomycota, der Ordnung Saccharomycetales und zu der Familie der Candidaceae. Er kommt nur diploid und in einer ungeschlechtlichen Form vor, wobei die diploide Zellform eine klonale Vermehrung aufweist, d. h. Rekombination zwischen Subtypen ist sehr selten. Das Fehlen eines sexuellen Stadiums führte dazu, dass *C. albicans* lange Zeit zu den Fungi imperfecti gezählt wurde (Gräser *et al*., 1996; Anderson *et al*., 2001). Allerdings konnten mittlerweile auch in *C. albicans* Gene identifiziert werden, welche eine Homologie zu dem *MAT*-Paarungstyp-Locus von *S. cerevisiae* aufweisen (Hull und Johnson, 1999). Durch Analyse von 500 in *S. cerevisiae* an der sexuellen Differenzierung beteiligten Genen konnte festgestellt werden, dass *C. albicans* zahlreiche Homologe zu diesen Komponenten besitzt (Tzung *et al*., 2001). *C. albicans* Stämme, die heterozygot für den *MAT*-Locus sind, stellen eine paarungsinkompetente Form dar. Da jedoch 95 % aller klinischen *C. albicans* Isolate heterozygot sind, erklärt dies die späte Entdeckung der sexuellen Vermehrung dieses Pilzes (Lohse und Johnson, 2009). Durch genetische Manipulation ist es jedoch möglich homozygote *MAT*-Locus Stämme zu erschaffen, welche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* fusionieren können (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000; Lachke *et al.*, 2003). Daraus hervorgehende tetraploide Stämme können durch einen Chromosomenverlust wieder den diploiden Zustand erreichen (Bennett und Johnson, 2003).

Eine wichtige Rolle im Paarungsprozess von *C. albicans* spielen die beiden morphologischen Zellformen *white* und *opaque*. Im Gegensatz zu den *white*-Zellen stellen die *opaque*-Zellen die paarungskompetente Form dar und weisen eine 10^6-fach höhere Paarungseffizienz auf. Daher ist der Wechsel der Zellform von *white* zu *opaque* ein kritischer Punkt in der sexuellen Vermehrung von *C. albicans* (Miller, M.G. und Johnson, 2002). Bei *white*-Zellen handelt es sich um runde, weiße Zellen, wohingegen *opaque*-Zellen eine stäbchenförmige Zellform mit gräulicher Färbung aufweisen. Neben den morphologischen Unterschieden konnten auch Unterschiede hinsichtlich der Generationszeit, der Sensitivität gegenüber unterschiedlichen Temperaturen und in der Fähigkeit Hyphen zu bilden beobachtet

werden (Slutsky *et al.*, 1987). Beide Zellformen weisen auch unterschiedliche Genexpressionsmuster unter verschiedenen Induktionsbedingungen auf. So antworten *opaque*-Zellen auf ein wahrgenommenes Paarungspheromon mit Paarung und *white*-Zellen mit Biofilm Bildung (Daniels *et al.*, 2006). Dies führt zu einer unterschiedlichen Funktion beider Zellformen bei der Wirtsinfektion. So dienen Zellen der *white*-Form einer Verbreitung im Blutkreislauf und *opaque*-Zellen der Besiedlung von Zelloberflächen (Kvaal, C.A. *et al.*, 1997; Kvaal, C.A. *et al.*, 1999; Lachke *et al.*, 2003).

Neben den *white*- und *opaque*-Zellen kann *C. albicans* noch andere morphologische Erscheinungsformen annehmen. So ist *C. albicans* in der Lage sowohl in einer Hefeform als auch in einer filamentösen Hyphenform zu wachsen, eine Fähigkeit, die als Dimorphismus bezeichnet wird (Abb. 1.1) (Odds, 1988). Der Dimorphismus gilt als bedeutendste Virulenz-

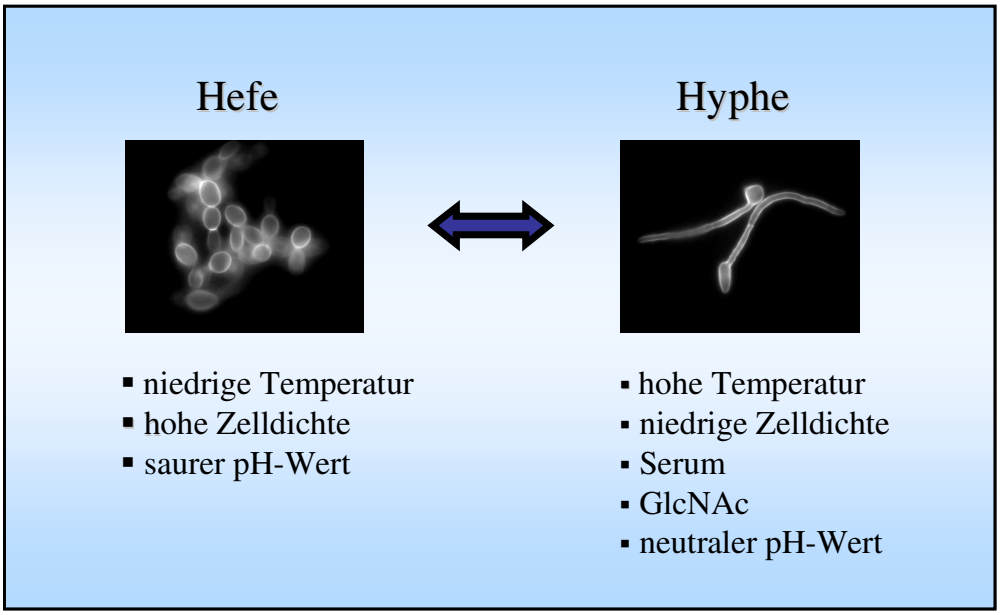


Abb. 1.1: Dimorphismus von *C. albicans*. Dargestellt sind die Hefeform und die filamentöse Hyphenform, die durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen induziert werden. Zellwände wurden durch Calcofluor-white angefärbt.

eigenschaft von *C. albicans* und stellt eine optimale Anpassung an den Infektionsverlauf dar. Dabei kommt der kugeligen Hefeform besonders im frühen Verlauf einer Infektion eine entscheidende Rolle zu (Saville *et al.*, 2003). Durch Knospung ist diese in der Lage sich schnell zu vermehren und kann dann über den Blutstrom im gesamten Wirtskörper verteilt werden (Cutler, 1991). Die filamentöse Hyphenform hingegen ermöglicht eine Adhäsion an und Penetration von Epithel- und Endothelzellen des Wirtsgewebes (Odds, 1994; Hostetter, 1994; Weide und Ernst, 1999). Durch diese Morphologie ist *C. albicans* außerdem in der Lage nach Phagocytose durch Makrophagen aus diesen wieder herauszuwachsen und so dem Immunsystem zu entkommen (Vasquez-Torres und Balish, 1997). Dies lässt vermuten, dass die Hyphenform die virulentere Wachstumsform zu sein scheint. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine konstitutiv filamentöse Wachstumsform eine verminderte Virulenz aufweist

(Gow *et al.*, 2002). Daher haben beide Wachstumsformen eine wichtige Funktion in der Pathogenität von *C. albicans*. Unter Standard-Wachstumsbedingungen in YPD-Vollmedium und einer Temperatur von 30 °C wächst *C. albicans* als kugelige Blastospore. Zu einer Vermehrung dieser Wachstumsform kommt es durch Knospung mit anschließender Abschnürung von der Mutterzelle. Zu den filamentösen Wachstumsformen von *C. albicans* zählen die echten Hyphen und die Pseudohyphen. Mikroskopisch sind diese beiden Zellformen oft schwer voneinander zu unterscheiden, jedoch weisen sie charakteristische Unterschiede in ihrer Entstehung auf. So werden Pseudohyphen durch unipolare Knospung gebildet. Die entstandenen Tochterzellen weisen eine elongierte Zellform auf und es kommt zu keiner vollständigen Abtrennung von der Mutterzelle. Dies verleiht den entstandenen Zellketten einen filamentösen Charakter. Echte Hyphen entstehen durch einen kontinuierlich apikal wachsenden Keimschlauch, welcher anschließend sekundär septiert wird. Hinter einer gebildeten Septe können dann wiederum neue Hefezellen durch Knospung gebildet werden (Odds, 1988; Ernst, 2000).

Die Hyphenbildung kann durch verschiedene Wachstumsbedingungen induziert werden. Interessanterweise ähneln diese Induktionsbedingungen vielen Konditionen, die im menschlichen Körper vorkommen. So führt z. B. eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C zur Hyphenbildung. Aber auch andere positive Stimuli wie Serum, *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) und Prolin oder negative Stimuli wie ein neutraler pH-Wert, Sauerstofflimitierung und Hungerbedingungen („Spider"- oder „Lee´s"- Medium), begünstigen eine Hypheninduktion (Buffo *et al.*, 1984; Cassone *et al.*, 1985; Ernst, 2000; Land *et al.*, 1975; Riggle *et al.*, 1999). Serum gilt hierbei als besonders starker Induktor, wobei lange Zeit nicht bekannt war, welche Komponente für die Hypheninduktion verantwortlich ist und welche als entsprechender Sensor fungiert. Mittlerweile konnten Xu *et al*. zeigen, dass es sich bei dem induzierenden Bestandteil hauptsächlich um Muramyldipeptid, einen Bestandteil des Peptidoglykans handelt. Menschen sind nicht in der Lage Muraminsäure zu produzieren, bei der Quelle des Peptidoglykan handelt es sich daher um die unterschiedlichen Bakterien-Spezies im menschlichen Körper. In Säugetieren wird Peptidoglykan durch eine Leucin-reiche Wiederholungssequenz (LRR) der Sensoren Nod1 und Nod2 erkannt. Für *C. albicans* konnte analog nachgewiesen werden, dass die Adenylatzyklase Cyr1 durch direkte Bindung von Muramyldipeptiden an die LRR-Domäne aktiviert wird. Daraufhin wird ein cAMP-Signal generiert, welches am Ende der Signalkaskade filamentöses Wachstum bewirkt (Xu *et al*., 2008). Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich ebenfalls um einen Pilz, der in der Lage ist filamentös als Pseudohyphe zu wachsen. In diesem Fall haben die erwähnten Stimuli jedoch keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum. Andererseits bewirken Stickstoffmangelbedingungen, die in *S. cerevisiae* zur Pseudohyphenbildung führen, auch in *C. albicans* eine Hyphenbildung (Csank *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994). Der Dimorphismus ist jedoch nicht immer gleich zu setzen mit Pathogenität. So existieren Pilze, die einen Dimorphismus ausprägen, wie z. B. *S. cerevisiae*, welche jedoch apathogen sind. Andererseits können Gattungen wie *Aspergillus,* die nur über ein filamentöses Wachstum

verfügen, sowohl pathogene als auch apathogene Vertreter besitzen.

Eine weitere morphologische Erscheinungsform von *C. albicans* sind die Chlamydosporen. Es handelt sich hierbei um dickwandige Zellen, die an den Enden von elongierten Suspensorzellen von Hyphen oder Pseudohyphen entstehen können (Joshi *et al.*, 1993). Die Bildung dieser Chlamydosporen wird durch eine geringe Zelldichte, Nährstoffarmut, Sauerstoffarmut und niedrige Temperaturen (25-30 °C) induziert. Im Labor können Chlamydosporen auf Maismehl-Agarpatten induziert werden, wobei beachtet werden muss, dass Glukose die Ausbildung von Chlamydosporen hemmt (Dujardin *et al.*, 1980b, 1980a). Die genaue biologische Bedeutung der Chlamydosporen für *C. albicans* ist bisher unklar. Vermutlich handelt es sich um eine Überdauerungsform. Die Chlamydosporenbildung wird routinemäßig zur Unterscheidung von *C. albicans* und anderen *Candida* Arten verwendet. Die molekularen Mechanismen dieser Zelldifferenzierung sind jedoch bisher nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass z. B. der Transkriptionsfaktor Efg1 essentiell für die Chlamydosporenbildung ist (Sonneborn *et al.*, 1999a).

1.4 Regulation des Dimorphismus

Phylogenetische Sequenz-Analysen der ribosomalen 16S-rRNA und der mitochondrialen DNA zeigen, dass *C. albicans* und die Bäckerhefe *S. cerevisiae* eng verwandt sind. Neben dieser Verwandtschaft haben diese beiden Pilze auch eine Gemeinsamkeit in ihrer morphologischen Erscheinungsform, da sie eine filamentöse Wachstumsform ausbilden. Daher kann die Regulation des Dimorphismus bei *S. cerevisiae* als Modell zur Analyse der entsprechenden Prozesse in *C. albicans* verwendet werden. In *S. cerevisiae* existieren zwei Signaltransduktionswege, die für die Regulation der Pseudohyphenbildung zuständig sind. Durch Komplementationstests mit entsprechenden *S. cerevisiae* Disruptionsstämmen konnten nahezu zu allen Komponenten dieser beiden Signaltransduktionswege Homologe in *C. albicans* identifiziert werden. Diese beiden Signaltransduktionswege sind zum einen eine „mitogen activated protein kinase"-Kaskade (MAPK-Kaskade) und zum anderen der Proteinkinase A (PKA)-Weg.

Zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade in *C. albicans* kommt es über das monomere G-Protein Ras1 (Leberer *et al.*, 2001; Gimeno *et al.*, 1992). Die Signalweiterleitung verläuft über die GTPase Cdc42 zu der Proteinkinase Cst20 und anschließend zu dem eigentlichen MAPK-Modul bestehend aus Hst11, Hst7 und Cek1. Zum Schluss erfolgt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Cph1 durch Phosphorylierung (Liu *et al.*, 1994; Csank *et al.*, 1998). In *C. albicans* und auch in *S. cerevisiae* wird neben dem filamentösen Wachstum auch das Paarungsverhalten über diesen Signalweg reguliert, wobei es sich bei der benötigten MAP-Kinase in *C. albicans* um Cek2 und in *S. cerevisiae* um Fus3 handelt (Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt

werden, dass dieser Signalweg nicht alleine für die Filamentbildung verantwortlich ist. So ist ein Defekt in der Filamentbildung nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu beobachten. Eine durch Serum ausgelöste Hypheninduktion ist weiterhin möglich (Liu *et al.*, 1994; Csank *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu führen Mutationen im PKA-Weg zu einem vollständigen Defekt in der Filamentbildung und somit zu einer verminderten Virulenz (Feng *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2001; Miwa *et al.*, 2004; Maidan *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* werden noch weitere Abläufe über diesen Signaltransduktionsweg reguliert. Zu diesen zählen z. B. die zelluläre Antwortreaktion auf oxidativen, osmotischen oder hitzebedingten Stress oder auch die Kontrolle der Eisenaufnahme (Charizanis *et al*., 1999; Norbeck und Blomberg, 2000; Smith *et al*., 1998; Robertson *et al*., 2000). Diese Art der Stressregulation konnte bisher für *C. albicans* nicht beobachtet werden (Enjalbert *et al.*, 2003). Analog zum MAPK-Weg wird auch in diesem Weg das Signal über das G-Protein Ras1 vermittelt. Im nächsten Schritt erfolgt die Aktivierung der Adenylatzyklase Cdc35, welche die Bildung von cAMP aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat katalysiert und somit zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Der cAMP-Spiegel wird daneben zusätzlich durch die Phosphodiesterase Pde2 reguliert, welche die Hydrolyse von cAMP katalysiert (Jung und Stateva, 2003; Rocha *et al.*, 2002). Durch die Bindung von cAMP an die PKA kommt es zu einer Konformationsänderung und damit zur Freisetzung der inhibierenden regulatorischen Untereinheit Bcy1. In *S. cerevisiae* besitzt die PKA drei Isoformen von katalytischen Untereinheiten (Tpk1, Tpk2 und Tpk3) und die inhibierende Untereinheit Bcy1. In *C. albicans* konnten neben Bcy1 nur zwei weitere Isoformen der katalytischen Untereinheiten gefunden werden (Tpk1 und Tpk2) (Bockmühl *et al*., 2001). Beiden Isoformen kommt dabei eine unterschiedliche Funktion in der Hyphenbildung zu. So beeinflusst Tpk1 die Hypheninduktion auf festen und Tpk2 in flüssigen Medien (Cassola *et al.*, 2004). Die PKA aktiviert letztendlich den Transkriptionsfaktor Efg1, der als zentraler Regulator der Morphogenese von *C. albicans* fungiert (Stoldt *et al.*, 1997). Die Deletion von *EFG1* führt unter nahezu allen Induktionsbedingungen zu einem völligen Verlust der Hyphenbildung (Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000). Neben diesen gerade erwähnten Transkriptionsfaktoren existieren noch weitere Proteine, die einen positiven oder negativen Einfluss auf die Hyphenbildung ausüben. Da eine Deletion der Gene *RIM101*, *CPH2* und *TEC1* zu einer beeinträchtigten Hyphenbildung führt, gelten diese als Aktivatoren des filamentösen Wachstums (Lane *et al.*, 2001a; Schweizer *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Zu den Repressoren hingegen zählen die Transkriptionsfaktoren Tup1, Nrg1 und Rfg1. Dabei erfolgt die Repression durch eine Rekrutierung von Tup1 an die spezifischen Promotoren, welche durch die DNA-bindenden Proteine Nrg1 und Rfg1, vermittelt wird (Murad *et al.*, 2001a).

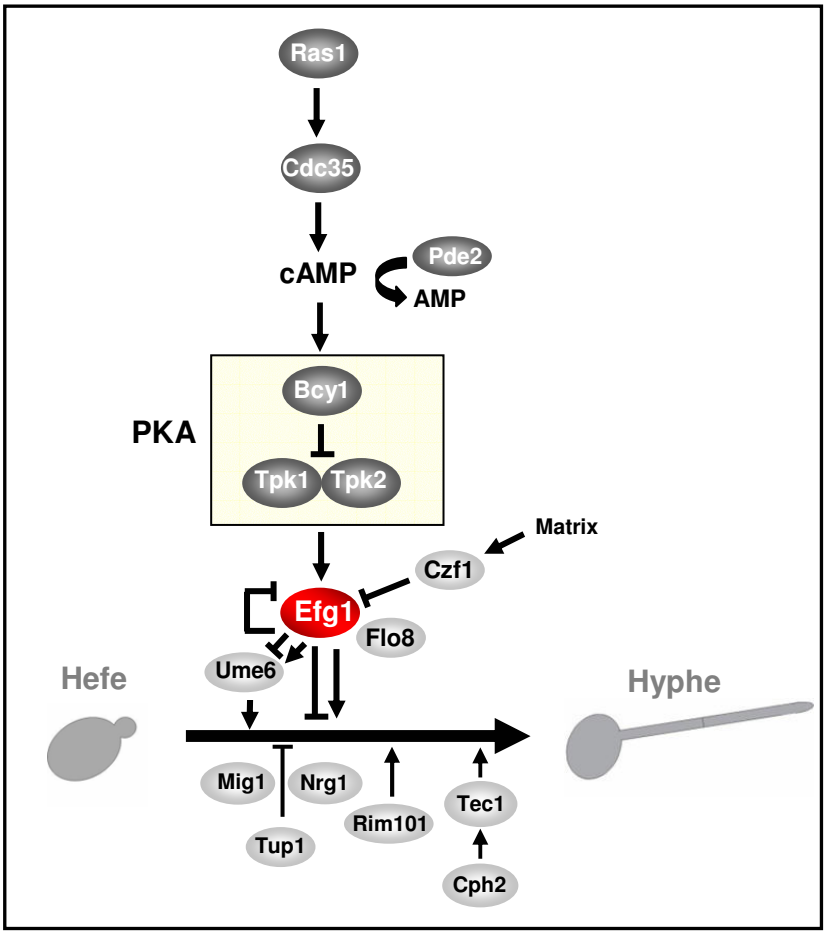


Abb. 1.2: Regulation der Hyphenbildung über den Proteinkinase A (PKA)-Weg. Der Transkriptionsfaktor Efg1, der als zentraler Regulator der Morphogenese von *C. albicans* gilt, ist rot unterlegt. Weitere Transkriptionsfaktoren sind hell unterlegt. Die regulatorischen Untereinheiten der PKA sind gelb unterlegt.

1.5 Der Transkriptionsfaktor Efg1

Der Transkriptionsfaktor Efg1 wurde in einem Screen mit einer genomischen *C. albicans* Bank in *S. cerevisiae* als Auslöser pseudohyphalen Wachstums identifiziert (Stoldt *et al.*, 1997). Neben seiner Funktion in der Regulation des Dimorphismus werden noch weitere morphogenetische Prozesse von Efg1 gesteuert. Es zeigte sich der Einfluss auf die Chlamydosporenbildung dadurch, dass *efg1*-Mutanten nicht mehr in der Lage sind diese zu bilden (Sonneborn *et al.*, 1999b). Aber auch der Metabolismus gehört zum Wirkungsbereich von Efg1. Durch genomweite Transkriptomanalysen wurde gezeigt, dass Glykolysegene durch Efg1 aktiviert und Gene des oxidativen Stoffwechsels reprimiert werden (Doedt *et al.*, 2004). In einer transkriptomalen Kurzzeitkinetik wurde zudem der positive Einfluss von Efg1 auf die Biofilmbildung deutlich. So wurden unter hypoxischen Bedingungen für die Biofilmbildung benötigte Gene in Abhängigkeit von Efg1 reguliert. Zu den beteiligten

Gengruppen zählten dabei Gene des Schwefelmetabolismus, der Glykolyse oder der Eisenaufnahme (Stichternoth und Ernst, 2009). Das *EFG1*-Gen ist auf dem R Chromosom lokalisiert und kodiert für ein 552 Aminosäuren großes Protein. Ungewöhnlich ist, dass zwei unterschiedlich große Transkripte von *EFG1* existieren. Ein 3,2 kb-großes Haupttranskript und ein ca. 20-fach geringer transkribiertes 2,2 kb-großes Nebentranskript (Tebarth *et al.*, 2003). Die Beobachtung, dass *white*-Zellen ausschließlich das 3,2 kb Transkript exprimieren und o*paque*-Zellen kaum bzw. keine *EFG1*-mRNA enthalten, zeigt den Einfluss von Efg1 auf den *white-opaque*-Phänotypwechsel. Eine Überexpression von Efg1 in *opaque*-Zellen führt zu einem Wechsel der Zellen in die *white*-Form (Srikantha *et al.*, 2000, Sonneborn *et al*., 1999). All dies spiegelt die globale Funktion von Efg1 als Regulator wider. Für einige Gene konnte bisher eine Efg1-abhängige Regulation gezeigt werden, wie z. B. für die sekretierten Aspartatproteasen *SAP4* und *SAP6* oder für die Zellwandproteine *HWP1* und *ALS1*. Ob diese Regulation jedoch direkt über das Efg1 selbst, über Efg1 als Komponente eines Homo- oder Heterodimers oder indirekt über ein unbekanntes Protein erfolgt, ist bisher noch nicht vollständig bekannt.

Durch Sequenzanalysen konnte Efg1 als ein Transkriptionsfaktor der APSES-Proteinfamilie identifiziert werden. Sämtliche Mitglieder dieser Gruppe gelten als Regulatoren von morphogenetischen Prozessen in Ascomyceten. Die Bezeichnung APSES wurde aufgrund der Anfangsbuchstaben der zuerst identifizierten Proteine gewählt (Asm1, Phd1, Sok2, Efg1, StuA) (Aramayo *et al.*, 1996; Gimeno und Fink *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1992). Charakteristisch für APSES-Proteine ist das Vorhandensein einer 100 Aminosäuren großen APSES-Domäne, die zu 80 % unter den Mitgliedern konserviert ist. Außer einem ungewöhnlich hohen Anteil an Serin- und Glutaminresten, weisen die APSES-Proteine, außerhalb der APSES-Domäne keine weiteren Ähnlichkeiten auf. Mittlerweile konnten zu der APSES-Familie zwei weitere Mitglieder hinzugefügt werden; das zu Efg1 homologe Efh1 (Efg1 Homolog) aus *C. albicans* und PmStuA aus *Penicillium marneffei* (Bornemann *et al*., 2002).

Transkriptionsfaktoren binden spezifische Sequenzen in der DNA und regulieren so die Genexpression. Dabei werden sie allgemein in die strukturellen Familien der Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren, der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, der Helix-Turn-Helix-Transkriptionsfaktoren und der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren unterschieden. Aufgrund des innerhalb der APSES-Domäne liegenden bHLH-Motivs wird Efg1 in die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren eingeordnet. Kennzeichnend für ein solches Motiv ist eine Struktur bestehend aus zwei amphipatischen Helices, die über einen variablen Loop miteinander verbunden sind. Der basische Bereich dient dabei der DNA-Bindung und die Helices werden für Proteininteraktionen benötigt. Bekannte Mitglieder dieser Gruppe von bHLH-Transkriptionsfaktoren sind unter anderem Max, Myc und MyoD (Ferre-d'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994). MyoD steuert dabei während der Embryogenese die Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen und Myc und Max weisen Funktionen in der Regulation der Apoptose, Zell-Proliferation und anderen

Differenzierungsprozessen auf. bHLH-Trankriptionsfaktoren binden meistens nicht als Monomer, sondern in der Form von Homo- oder Heterodimeren an die DNA, wobei die Dimerisierung über eine Interaktion der amphipathischen Helices der Helix-Loop-Helix-Domäne erfolgt (Ma *et al.*, 1994). Dadurch ergeben sich vielfältige Kombinationsmöglichkeiten. Von dem bHLH-Transkriptionsfaktor Max ist bekannt, dass er sowohl mit sich selbst Homodimere, als auch mit Myc, Mad oder Mxi1 Heterodimere ausbilden kann. In Zwei-Hybrid-Experimenten wurde bereits gezeigt, dass das zweite APSES-Protein von *C. albicans*, Efh1, in der Lage ist Homodimere auszubilden (Bockmühl, 2001). In dieser Arbeit können nun auch Daten gezeigt werden, die ebenfalls auf eine Homodimerisierung von Efg1 schließen lassen.

Durch unterschiedliche Dimerisierungspartner kann die Fähigkeit zur Regulation der Genexpression erheblich variieren. So kann der Transkriptionsfaktor Myc durch einen Austausch der Dimerisierungspartner aktivierend bzw. reprimierend wirken (Bernards, 1995). Diese Fähigkeit sowohl als Aktivator als auch als Repressor zu wirken, trifft auch auf den Transkriptionsfaktor Efg1 zu. Unter normalen aeroben Bedingungen wird die Hyphenbildung durch Efg1 über den PKA-Signaltransduktionsweg induziert. Liegen jedoch sauerstoffarme Wachstumsbedingungen vor, wie z. B. unter Matrixeinbettung, dann führt die Deletion von *EFG1* sogar zu einem hyperfilamentösen Phänotyp (Sonneborn *et al.*, 1999b; Setiadi, E.R. *et al.*, 2006). Unter anaeroben Bedingungen fungiert Efg1 also als Repressor. In diesem Zusammenhang wird der Transkriptionsfaktor Czf1 als Interaktionspartner von Efg1 diskutiert, der unter anaeroben Bedingungen als Gegenspieler von Efg1 fungiert (Giusani *et al.*, 2002; Vinces *et al.*, 2006). Dabei bewirkt eine Überexpression von *CZF1* eine verstärkte und die Deletion des Gens eine verringerte Hyphenbildung. Die bivalente Funktion von Efg1 hinsichtlich der Genregulation zeigt sich auch z. B. in der Tatsache, dass Efg1 als Aktivator des fermentativen Metabolismus und Repressor des oxidativen Metabolismus fungiert. Die Repressorfunktion von Efg1 wird in der negativen Autoregulation von *EFG1* deutlich (Tebarth *et al.*, 2003). So konnte mittels Northernanalyse gezeigt werden, dass parallel zur Hypheninduktion die Menge des 3,2 kb-großen *EFG1*-Transkripts abnimmt (Stoldt *et al.*, 1997). Diese Abnahme des *EFG1*-Transkripts konnte auch durch Real time-PCR bestätigt werden (Lassak, pers. Mitteilung). Unterbleibt diese negative Rückkopplung dann bilden die Zellen Pseudohyphen anstelle von echten Hyphen (Tebarth, 2001). Diese Pseudohyphenbildung kann auch bei einer Überexpression von *EFG1* in *S. cerevisiae* beobachtet werden. Auch die Überexpression von *EFH1* induziert das filamentöse Wachstum (Bockmühl, 2001). Phänotypisch sichtbar wird der Effekt einer *EFH1* Deletion jedoch erst bei zusätzlicher Deletion von *EFG1*. Unter anaeroben Bedingungen wird deswegen durch die Deletion von *EFH1* der hyperfilamentöse Phänotyp der *efg1*-Mutante verstärkt (Stempel, 2003). Eine Bestätigung für die negative Autoregulation ergaben Chromatinimmunpräzipitations-Analysen, in denen eine Bindung von Efg1 an seinen eigenen Promotor gezeigt werden konnte (Doedt, 2003). Die Regulation des *EFG1*-Gens wird

vermutlich durch Interaktion von Efg1 mit dem Rpd3/Sin3 Histondeacetylase-Komplex vermittelt. So konnte durch Zwei-Hybrid-Analysen eine Interaktion von Efg1 und Sin3 nachgewiesen und das Ausbleiben der negativen Autoregulation in einer *sin3*-Mutante gezeigt werden (Doedt, 2003; Tebarth *et al.*, 2003). Durch ChIP-Analyse konnte ebenfalls die Bindung von Sin3 an den *EFG1*-Promotor bestätigt werden (Doedt, 2003).

Für Mitglieder der Gruppe der bHLH-Trankriptionsfaktoren ist eine Bindung an das DNA-Bindemotiv einer E-Box mit der Konsensus-Sequenz 5´-CANNTG-3´ bekannt (Massari und Murre, 2000; Robinson und Lopes, 2000). Da die bHLH-Domäne von Efg1 viele konservierte Aminosäuren enthält, die wichtig für die DNA-Bindung sind, wurde das Bindemotiv einer E-Box als potentielles Bindemotiv für Efg1 angenommen (Stoldt *et al.*, 1997). Dabei konnten *in vitro* Hinweise für eine Bindung an eine E-Box der Sequenz 5´-CATTTG-3´ und der Sequenz 5´-CATATG-3´ erhalten werden (Leng *et al.*, 2001; Noffz, 2006).

Eine weitere Homologie besteht zwischen der APSES-Domäne von Efg1 und der N-terminalen Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Mbp1 (Koch *et al.*, 1993). Dieser zählt zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche in der Lage sind ein MCB-Element (MluI Cell cycle Box) der Sequenz 5´-ACGCGT-3´ zu binden. In *S. cerevisiae* bindet dabei das Heterodimer aus Mbp1 und dem Cofaktor Swi6 als MBF (MCB-Binding-Factor)-Komplex das besagte DNA-Bindemotiv. MCB-Elemente kommen in *S. cerevisiae* gehäuft in Promotoren von Zellzyklus regulierten Genen vor (McIntosh, 1993). Da durch Interaktion mit unterschiedlichen Dimerisierungspartnern es Proteinen möglich ist, ihre DNA-Bindespezifität zu variieren, wurde auch das MCB-Element als Bindemotiv für Efg1 untersucht. Dabei konnte durch *in vivo* Studien in *S. cerevisiae* (Doedt, 2000; Doedt, 2003) und in *C. albicans* (Hilbig, 2004; Kurtz, 2007) eine Bindung des MCB-Bindemotivs durch Efg1 gezeigt werden. Eine *in vitro* Bindung wurde auch durch EMSA nachgewiesen (Bußmann, 2006). Daher wurden Reportergenstudien mit Promotoren von Genen, die eine starke Efg1-abhängige Regulation in Transkriptomanalysen zeigten, durchgeführt. Die Deletion von MCB-Elementen in Promotoren der Gene *YWP1* (GPI-Zellwandprotein) und *SAP2* (Aspartatprotease) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Regulation (Doedt 2003). Somit bleibt die Funktion von MCB-Elementen in der Regulation von Zielgenen durch Efg1 unklar.

Basierend auf der negativen Autoregulation des *EFG1*-Promotors wurde in einer *in vitro* Footprint-Analyse ein Fragment des *EFG1*-Promotors auf mögliche Zielsequenzen für Efg1 untersucht. Dabei konnte eine 13 bp-lange Region durch Bindung von GST-Efg1 aus *E. coli* vor einem DNAse I-Verdau geschützt werden (Abb. 1.3). Die Sequenz der Region lautet 5´-TATGCATATATGC-3´. Bei näherer Betrachtung der geschützten Region und deren Sequenzumgebung konnten unterschiedliche Wiederholungssequenzen identifiziert werden. Zu ihnen zählen zwei invertierte Sequenzen von 10 bp- und 12 bp-Länge und vier direkte Sequenzwiederholungen von 8 bp-Länge. Interessanterweise taucht auch eine dreifache Sequenzwiederholung des Palindroms TATGCATA auf. In einer transkriptomalen Kurzzeitkinetik wurden zudem von Stichternoth

frühe Zielgene von Efg1 mithilfe eines induzierbaren "tet-on"-Systems untersucht. Dabei zeigte sich, dass 20 der durch Efg1 regulierten Gene kein MCB-Element enthielten, sondern ATGCAT/TTGCAA Sequenzen. Daher wird das als APSES response element (ARE) bezeichnete Palindrom der Sequenz TATGCATA und dessen Derivate (ARE box-2 ATGCAT, ARE box-3 TTGCAA, ARE box-4 WTGCAW) als neues potentielles DNA-Bindemotiv von Efg1 angenommen.

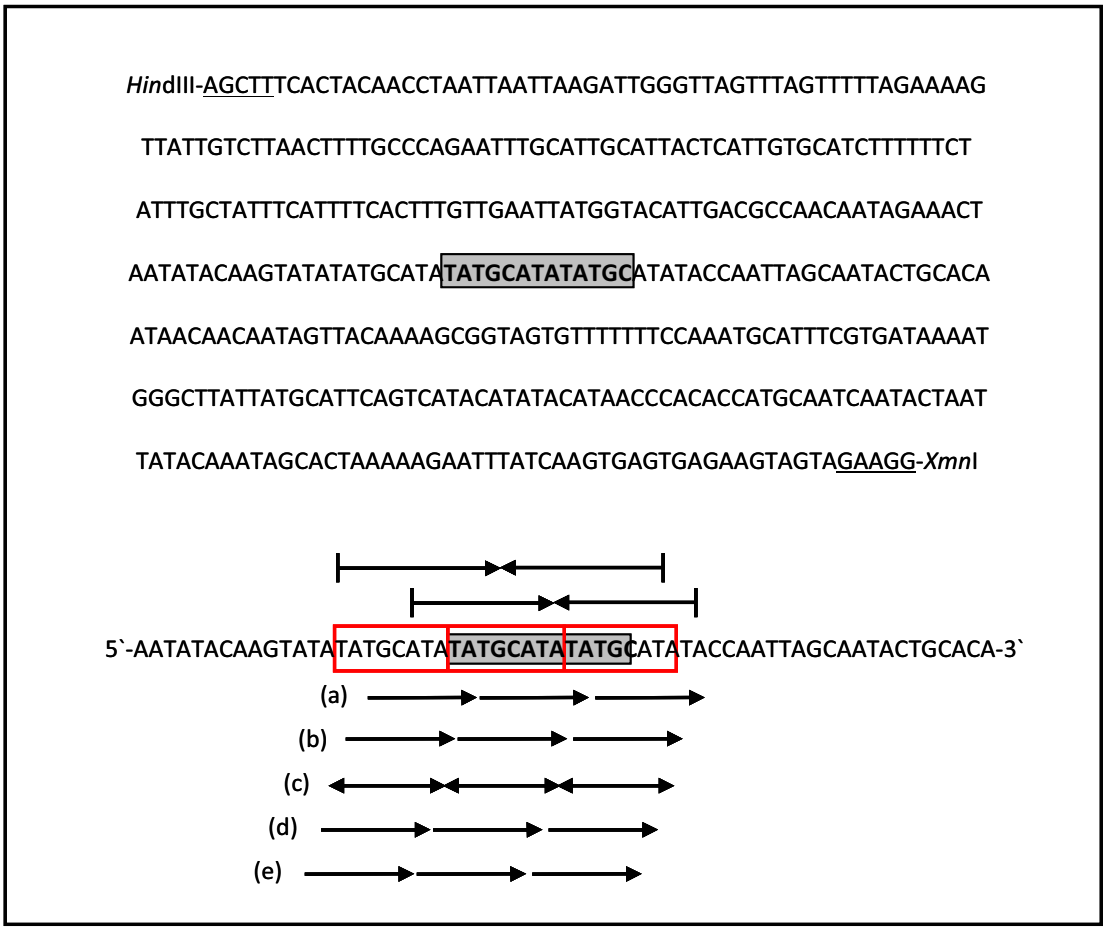


Abb. 1.3: Sequenz eines 408 bp *EFG1*-Promotorfragments. Die in einer Footprint-Analyse vor DNAse I-Verdau geschützte Region ist grau unterlegt. Invertierte Sequenzen sind durch Pfeile oberhalb des Sequenzausschnitts angezeigt. 8 bp-lange Sequenzen, die drei direkte Wiederholungen aufweisen sind durch Pfeile unterhalb des Sequenzausschnittes angezeigt. Die einzige palindromische Wiederholungssequenz (c) ist rot umrandet.

Die Funktion bzw. Aktivität eines Proteins kann durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Zu den häufigsten Modifikationsmöglichkeiten zählen unter anderem die Methylierung, die Ubiquitinierung, die Acetylierung oder auch die Phosphorylierung. Aufgrund des ungewöhnlichen Laufverhaltens von Efg1 in Immunoblot-Analysen wird auch für Efg1 eine posttranslationale Modifikation angenommen. So zeigt das 552 Aminosäuren große Efg1 mit einer berechneten molekularen Masse von ca. 61 kDa nicht die erwartete Laufhöhe im Immunoblot, sondern tritt in einer Laufhöhe von ca. 83 kDa auf. Der Grund dieses ungewöhnlichen elektrophoretischen Laufverhaltens ist bisher nicht bekannt. Allerdings konnte bereits in Dephosphorylierungs-Versuchen mit alkalischer

Phosphatase eine Phosphorylierung von Efg1 nachgewiesen werden. Grundlage dieser Versuche war die Beobachtung, dass Efg1 im Immunoblot als Dreifachbande detektiert werden kann (Sonneborn, 1999). Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase konnte jedoch nur noch die unterste der drei Banden nachgewiesen werden (Bockmühl, 2001).

Außerdem konnte durch Aminosäureaustausch einer potentiellen PKA-Phosphorylierungsstelle an der Position 206 mit der Konsensussequenz R-V-T die Bedeutung dieser Phosphorylierung für die Regulation der Hyphenbildung geklärt werden (Kennelly *et al*., 1991). So kann Efg1 nach dem Aminosäureaustausch den *efg1*-Deletionsphänotyp nicht mehr komplementieren (Bockmühl und Ernst, 2001). Außerdem wurde durch weitere gezielte Aminosäureaustausche die Bedeutung dieser Aminosäuren auf die Efg1-vermittelte Regulation der Morphogenese bei *C. albicans* untersucht (Bockmühl, 2001). Neben dem bereits angesprochenen Austausch an Position 206, wurde als Kontrolle zusätzlich der Austausch an Position 207 durchgeführt. Durch Mutation der Position 208 wurde das an Position 208-211 befindliche Motiv T-M-W-E für die Phosphorylierung durch die Caseinkinase II verändert (Kennelly und Krebs, 1991). APSES-Proteine weisen an der Position 248 im bHLH-Motiv ein Threonin auf, während bHLH-Proteine aus Säugern hier ein Glutamat besitzen; somit handelt es sich bei T248 um eine weitere potentielle Regulierungsstelle. An Position 241 befindet sich bei den APSES-Proteinen ein konserviertes Leucin, wobei im Gegensatz dazu bei anderen bHLH-Proteinen ein Arginin konserviert ist, für das eine Beteiligung der DNA-Bindung von Max und MyoD beschrieben wurde (Ferré-D'Amaré *et al*., 1993; Ma *et al*., 1994). An Position 262 verhält es sich genau umgekehrt. Hinsichtlich des elektrophoretischen Laufverhaltens konnte festegestellt werden, dass die Varianten der Positionen 241, 248 und 262 nicht als Dreifachbande, sondern nur als einzelne Efg1-Bande detektiert werden können. Ebenso waren die Mutanten mit diesen Aminosäureaustauschen nicht in der Lage, bei Überexpression Pseudohyphen auszubilden oder in festem oder flüssigem Spider-Medium filamentös zu wachsen. Auch war die Fähigkeit Chlamydosporen zu bilden nicht mehr gegeben. Dies verdeutlicht, dass neben der Proteinkinase A vermutlich noch andere Kinasen an der Regulation dieses Transkriptionsfaktors beteiligt sein müssen. Bei allen Mutanten mit veränderter Phosphorylierungsstelle kann allerdings eine indirekte Beeinflussung der Phosphorylierung z. B. durch veränderte Proteinkonformation, nicht völlig ausgeschlossen werden.

1.6 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

Ein wichtiges Verfahren in der biochemischen Forschung ist die Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen. Gereinigte Proteine finden unter anderem Einsatz bei der Herstellung von spezifischen Antikörpern, bei der Proteinkristallisation oder können zur Proteincharakterisierung durch Massenspektroskopie eingesetzt werden. Proteinkristalle

können einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden, welche der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins und somit der Erforschung von z. B. potentiellen Cofaktor-Bindestellen dient. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit in der Proteinbiochemie stellt der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) dar, wobei Fluorochrom-markierte Proteine zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen oder von Wechselwirkungen des Proteins mit spezifischen DNA-Fragmenten eingesetzt werden.

Zu Beginn einer Proteinreinigung steht zunächst die Wahl eines geeigneten Wirtsorganismus und eines entsprechenden Expressionssystems. Häufig fällt die Wahl dabei auf bakterielle Expressionssysteme, da mit diesen zeit- und kostengünstig hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein hergestellt werden können. Der gängigste Vertreter bakterieller Expressionssysteme ist dabei *Escherichia coli*, für den eine Vielzahl an Expressionssystemen mit unterschiedlich regulierbaren Promotoren zur Verfügung steht. Daneben kommen aber auch *Bacillus* oder *Pseudomonas* Arten zum Einsatz. Ein großer Nachteil bakterieller Expressionssysteme liegt jedoch in dem nicht Vorhandensein von posttranslationalen Modifikationen des rekombinanten Proteins. Viele Proteine werden jedoch posttranslational phosphoryliert oder glykosyliert. Daher müssen alternativ Hefe-Expressionssysteme wie z. B. *Saccharomyces, Pichia* oder *Hansenula* verwendet werden.

Zur affinitätschromatographischen Isolierung eines rekombinanten Proteins muss dieses mit einem Epitop (*tag*) markiert werden. Der Affinitäts-*tag* ist ein kurzes Protein-Anhängsel oder Peptid das an das zu reinigende Protein fusioniert wird. Auf Grund der hohen Bindeaffinität zu einem matrixgebundenen Liganden kann somit das Zielprotein in einem Schritt aufgereinigt werden. Ein effizienter Affinitäts-*tag* sollte dabei einige wichtige Kriterien erfüllen. So sollte der *tag* die Tertiärstruktur und die Funktion des rekombinanten Proteins nicht beeinflussen, er sollte einfach und spezifisch nachzuweisen sein, er sollte wieder zu entfernen sein und er sollte für eine Vielzahl von Proteinen verwendet werden können (Terpe, 2003). Der modernen Biotechnologie steht mittlerweile eine große Anzahl von Affinitäts-*tags* zur Verfügung. Lange *tags* wie z. B. das Maltose Bindeprotein (MBP) oder die Gluthation-S-Transferase (GST) können zwar die Löslichkeit und Stabilität eines Proteins erhöhen, jedoch sind sie stark immunogen, stören bei Kristallisationen oder können durch Interaktion mit dem zu reinigenden Protein dessen Konformation und Funktion beeinflussen. Daher wird meist nach erfolgter Affinitätschromatographie eine Abspaltung des *tags* mit Hilfe einer Protease vorgenommen. Kurze *tags* hingegen wirken nicht immunogen, verändern zumeist nicht die Proteinaktivität und müssen vor weiteren Anwendungen nicht entfernt werden. Als Beispiele für kurze *tags* sind dabei der c-myc-, FLAG-, HA-, oder V5-*tag* zu nennen. Die Peptidsequenz des c-myc-*tags* lautet EQKLISEEDL und basiert auf einer Interaktion des *tags* mit dem Immunglobulin 9E10. Dieser *tag* wird jedoch selten zur Proteinaufreinigung genutzt, da hierbei zur Elution des Zielproteins eine Veränderung des pH-Wertes in den sauren Bereich nötig ist und dies oft einen bedeutenden Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Der HA-*tag* ist ein 9 Aminosäuren langes Peptid der Sequenz YPYDVPDYA, welches aus dem Influenza-Virus von Hämagglutinin stammt. Der FLAG-*tag*

besteht aus acht Aminosäuren der Sequenz DYKDDDDK und bindet an die Antikörper M1, M2 und M5. Ein Vorteil dieses *tags* liegt darin, dass die Sequenz DDDDK von einer Enterokinase erkannt wird und somit abgespalten werden kann. Der V5-*tag* entstammt einem kleinen Epitop des P- und V-Proteins des Paramyxovirus. Der gängigste *tag* zur Proteinreinigung ist der Poly-Histidin-*tag*. Dabei wird eine unterschiedliche Anzahl von Histidinresten (meist 6-10) an das zu isolierende Protein fusioniert. Nach Expression des rekombinanten Proteins erfolgt dann die Proteinaufreinigung mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) (Porath *et al.*, 1975). Bei der IMAC werden divalente Kationen wie Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} an einer Matrix immobilisiert und interagieren mit dem Imidazolring von Histidinen. Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) ist dabei die am häufigsten verwendete Chelatgruppe für die Reinigung von Proteinen mit Histidin-*tag* (Hochuli *et al.*, 1987). NTA bindet 4 von 6 möglichen Bindungsstellen eines Ni^{2+}-Ions, wodurch eine stabile Komplexverbindung mit dem Metallion entsteht. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch Waschen mit einem Imidazol-haltigen Puffer. Dabei wird das Histidin kompetetiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt. Alternativ kann ein Puffer mit niedrigem pH-Wert verwendet werden, der zur Protonierung des Imidazol-Rings führt, wodurch dieser nicht mehr als Elektronendonor für die Interaktion mit der Ni-NTA-Matrix zur Verfügung steht. Vorteile eines Poly-Histidin-*tags* sind sein geringer Einfluss auf die Struktur und Funktion eines Proteins, die Möglichkeit ihn auch unter denaturierenden Bedingungen zu verwenden und die Fusion des *tags* sowohl am N- wie auch am C-terminalen Ende eines Proteins (Halliwell *et al.*, 2001). Eine Proteinreinigung unter anaeroben Bedingungen ist mit Hilfe dieses *tags* nicht möglich, da es dabei zu einer Reduzierung des Ni^{2+}-Ions kommt. Ebenso ist der Poly-Histidin-*tag* nicht geeignet, falls Metallionen einen funktionellen Bestandteil eines Proteins darstellen, da es zu einer Adsorption durch NTA kommen kann.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist ein zentraler Regulator der Morphogenese und des Metabolismus von *C. albicans*. Die als Dimorphismus bezeichnete Fähigkeit des Pilzes einen Wechsel zwischen der Hefe- und Hyphen-Wachstumsform zu vollziehen, stellt dabei eine entscheidende Virulenzeigenschaft dar. Um die molekularen Mechanismen der Regulation durch Efg1 weiter aufzuklären, war es Ziel dieser Arbeit für die biochemische Charakterisierung, die Aufklärung der Proteinstruktur sowie für verschiedene Studien zur Funktion des Efg1-Proteins dieses in den Organismen *E. coli*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* zu überexprimieren und affinitätschromatographisch zu isolieren. Des Weiteren sollte zur Identifizierung des von Efg1 gebundenen DNA-Sequenzmotivs in *S. cerevisiae* das Bindungsverhalten von Efg1 an verschiedene *EFG1*-Promotorbereiche untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, in der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Hamburg) bezogen. Radioisotope wurden von Hartmann Analytic (Braunschweig) erworben. Genutzte Gase stammten von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf).

Agarose (Gibco BRL)
Agar, Nutrient Broth (Oxoid)
Antibiotika, Ethidiumbromid, SDS, BSA (Serva)
Bradford-Reagenz (Bio Rad)
Bromphenol Blau (Janssen)
Carrier-DNA, Heringssperma (Clontech)
DNA Purification Kit (Qiagen)
Glasperlen, KCl , PEG, Glyzerin (Roth)
Glukose (Caesar & Lorentz GmbH)
ImmobilonP- Membran (Millipore)
Isopropanol (Fluka)
Magermilchpulver, HEPES (Applichem)
Natriumchlorid, Isopropanol (Riedel de Haen)
ONPG (Serva)
Pepton, Hefeextrakt, YNB w/o amino acids (Difco Labarotories)
Proteinmarker (Fermentas, Invitrogen)
Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
Restriktionsenzyme (NE Biolabs, Roche, MBI Fermentas, Gibco BRL)
Röntgenfilme (Fuji Rx-Med)
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)
X-GAL (Biotech Trade & Service GmbH)
Zymolyase (Seikagaku Kogyo Co. Ltd.)

2.2 Stämme

2.2.1 *E. coli*-Stämme

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
DH5αF‘	F^- [Φ80Δ(*lacZ*)M15] Δ(*lacZYA-argF*) *U169 recA1 endA1 hsdR17* $r_k^- m_k^+$ *supE44 thi-1 gyrA1 relA*	Hanahan, 1983 Woodcock *et al.*, 1989
XL1-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 lac*[F’ *proAB* $lacI^q Z\Delta M15$ *Tn10*(Tet^r)]	Bullock *et al.*, 1987
BL21(DE3)	*E. coli* B, F^-, *dcm*, *omp*T, *hsd*S($r_B^- m_B^-$), galλ (DE3)	Novagen
Rosetta 2 (DE3) pLysS	F-*ompT hsdSB*(rB- mB-) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE2 (CamR)	Merck

2.2.2 *C. albicans*-Stämme

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
BCA0901	*EFG1*, *efg1*::*URA3*+	A. D. Johnson, San Francisco
CAF2-1	*URA3*/ *ura3*::*imm434*	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	*ura3*::*imm434*/*ura3*::*imm434*	Fonzi und Irwin, 1993
HLC52	wie CAI4, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::*hisG-URA3-hisG*	Lo *et al*., 1997
HLC67	wie CAI4, aber *efg1::hisG/edg1::hisG*	Lo *et al.,* 1997
HLC67[pBI-1-His-Efg1]	HLC67, transformiert mit pBI-1-His-Efg1	Eichhof, 2008
HLC67[pBI]	HLC67, transformiert mit pBI-1	Eichhof, 2008
HLC67[pDK9]	wie HLC67, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*:: [*Efg1-HA-EFG1C218A-URA3*] (pDK9/*Pac*I integriert in *EFG1*)	diese Arbeit

HLCE	wie HLC67, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::[*EFG1-URA3*]	Lengeler
HLCEEFG1	wie HLC67, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::[*EFG1-HA-EFG1-URA3*] (pTD38-HA/*Pac*I integriert in *Efg1*)	Noffz, 2006
HLCPEFG1	wie HLC67, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::[*PCK1p-HA-EFG1-URA3*] (pBI-HAHYD/*Kpn*I integriert in *LEU2*)	Noffz, 2006
HLCP	wie HLC67, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::[*PCK1p -URA3* (pBI/*Kpn*I integriert in *LEU2*)	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D1	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D1	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D2	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D2	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D3	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D3	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D4	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D4	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D5	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D5	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D6	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D6	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D7	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D7	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D8	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D8	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D9	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D9	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D10	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D10	Noffz, 2006
HLCPEFG1-D11	wie HCLPEFG1, aber EFG1-D11	Noffz, 2006
tpk1mut	*tpk1*::*hisG*/ *tpk1*::*hisG* *ura3*Δ::*imm434*/ *ura3*Δ::*URA3*	Hynsook Park, (S.Filler)
tpk2mut	*tpk2*::*hisG*/ *tpk2*::*hisG* *ura3*Δ::*imm434*/ *ura3*Δ::*URA3*	Hynsook Park, (S.Filler)
H/1.22	wie HLC67, aber *efh1*::*hisG*/*efh1*::*hisG-URA3-hisG*	Krishnamurthy

2.2.3 *S. cerevisiae*-Stämme

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
BY 600	*MATα swi6 TRP1-197 ade2 ho*::*lacZ ura3 his3 leu2-3 –112 trp1-1 can1-100 met*	Lownds *et al*., 1992
RC1695	*MATα pep4-3 prb 1-1122 ura3-52 leu2 trp1*	Jones, 1990
RC1695[p426-Gal1-His-Efg1]	RC1695, transformiert mit p426-Gal1-His-Efg1	diese Arbeit
RC1695[p426-Gal1]	RC1695, transformiert mit p426-Gal1	diese Arbeit

2.3 Medien

2.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB (Vollmedium): 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 1 % Trypton

Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C. Zur Selektion plasmidkodierter Resistenzen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben bzw. Chloramphenicol in einer Konzentration von 50 µg/ml.

2.3.2 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium): 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

SD (Minimalmedium): 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose, ein pH-Wert von 6,9 wurde mit NaOH eingestellt

SCAA: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), 4 % Casaminosäuren

Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt. Das Wachstum der Hefen erfolgte bei 30 °C. Bei Bedarf wurden für das Wachstum von *S. cerevisiae* Aminosäuren nach Zimmermann (1975) hinzugegeben.
Dazu wurde eine Stocklösung der benötigten Aminosäuren hergestellt und von diesem Aminosäuremix 50 ml pro 1 l Medium zugesetzt.

Aminosäuremix (Zimmermann, 1975):
pro 1 l destilliertem Wasser

Adenin 0,28 g	Leucin 1,44 g	Tyrosin 0,72 g
Arginin 0,48 g	Methionin 0,48 g	Uracil 0,48 g
Histidin 0,48 g	Phenylalanin 1,2 g	Valin 0,72 g
Isoleucin 1,44 g	Threonin 0,72 g	
Lysin 0,72 g	Tryptophan 0,48 g	

2.3.3 Hypheninduktion bei *C. albicans* auf festen Medien

Zur Hypheninduktion auf festen Nährmedien wurden YPS-Platten und YPM-Platten verwendet. Die YPS-Platten enthielten 2 % Saccharose und die YPM-Platten 2 % Mannitol statt Glukose als Kohlenstoffquelle. Die Zellen wurden vereinzelt und mehrere Tage bei 25 bzw. 37 °C inkubiert und fotografisch dokumentiert.

2.3.4 Hypheninduktion bei *C. albicans* in flüssigem Medium

Zur Hypheninduktion in flüssigem Medium wurden die Stämme über Nacht angezogen, in destilliertem H_2O gewaschen und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde, das auf 37 °C vorgewärmte Induktionsmedium, auf eine OD_{600}=0,15 angeimpft, dem Medium wurden 10 % (v/v) Pferdeserum hinzugefügt und bei 110 Upm und 37 °C inkubiert. Die Quantifizierung der Hyphen erfolgte durch Auszählung von 100 Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten.

2.3.5 Induktion von Chlamydosporen in *C. albicans*

Die Induktion von Chlamydosporen erfolgte auf Maismehlagar-Platten (Corn Meal Agar von Difco) mit 0,5 % Tween 80 unter mikroanaeroben Bedingungen. Zur Erzeugung einer mikroanaeroben Umgebung wurden die Zellen vereinzelt und mit sterilen Deckgläsern abgedichtet. Eine Inkubation der Platten erfolgte mindestens fünf Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur.

2.3.6 Inkubation von *C. albicans* unter hypoxischen Bedingungen

Hypoxische Bedingungen wurden mit Hilfe der $Invivo_{200}$ Hypoxiebank (Ruskinn, England) erzeugt, wobei unterschiedliche Gas-und Temperaturbedingungen (0 % CO_2, 0,2 % O_2, 25 °C bzw. 6 % CO_2, 0,2 % O_2, 25 °C) eingestellt werden konnten. Die zu untersuchenden Stämme wurden auf YPS-Platten vereinzelt und für mehrere Tage unter Hypoxie inkubiert und anschließend dokumentiert.

2.4 Plasmide und Primer

2.4.1 Plasmide

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pET19-His-Efg1	pET19b mit *EFG1* über *Bam*HI und *Xho*I kloniert, 7359 bp	Tielker, unveröffentlicht
pBI-1-His-Efg1	wie pBI-1, aber *His-EFG1 Bgl*II/*Bam*HI mit *PCK1p* fusioniert	Eichhof, 2008
pBI-1	*CaARS, PCK1p, C.URA3, C.LEU2, ori, AmpR*	Stoldt *et al.,* 1997
p426 Gal1	*ApR, Gal1p, CTC1T, URA3*, 2 micron	Mumberg *et al*., 1994
pGEM-T	*f1ori, ApR, lacZ, ori*	Promega GmbH, Mannheim
pTD38-HA	Ligation von EFG1-HA (aus pBI-HAHYD/*Bgl*II) in pTD38	Lengeler
pYC7	minimal *CYC1p-lacZ*; *URA3*-Marker in 2 µm-Plasmid	Guarente und Mason, 1983; Chang und Timberlake, 1993
pMCB	3xMCB-Element ACGCGT in pYC7 (*Xho*I)	Lowndes *et al*., 1992a
pGADc1	*ADH1p-GAL4*-Aktivierungsdomäne (AD); *LEU2*-Marker	James *et al*., 1996
pDB16	*EFG1- GAL4-AD*-Fusion in pGADc1	Bockmühl, 2001
pTD26	major-Efg1 + 5'UTR in pUC18	Doedt, 2004
pET19-His-Efg1Kodon	wie pET19-His-Efg1, aber L449S	diese Arbeit
pET19-His-Efg1KodonT179E	wie pET19-His-Efg1Kodon, aber T179E	diese Arbeit
pET19-His-Efg1KodonT206E	wie pET19-His-Efg1Kodon, aber T206E	diese Arbeit
p-BI-1-His-Efg1T179E	wie pBI-His-Efg1, aber T179E	diese Arbeit
p-BI-1-His-Efg1T206E	wie pBI-His-Efg1, aber T206E	diese Arbeit

p426-Gal1-His-EFG1	wie p426-Gal1, aber *His-EFG1 Bam*HI/*Eco*RI mit *GAL1p* fusioniert	diese Arbeit
pDK9	wie pTD38-HA, aber C218A	diese Arbeit
pDK10	408bp-Fragment aus pTD26 amplifiziert mit Primerpaar 408XhoIfor und 408XhoIrev, eingefügt in *Xho*I-Schnittstelle von pYC7	diese Arbeit
pDK11	Δ 2 x ARE-Fragment aus pTD26 amplifiziert mit Primerpaar OH1hin und OH1her, eingefügt in *Xho*I-Schnittstelle von pYC7	diese Arbeit
pDK12	Δ 3 x ARE auf pDK10 durch Mutagenese-PCR mit Primerpaar 3xR-Box*BglII*insertFor und 3xR-Box*BglII*insertRev	diese Arbeit
pDK13	Del1 auf pDK12 durch Mutagenese-PCR mit Primerpaar Efg1-408bp-Muta1for und Efg1-408bp-Muta1rev	diese Arbeit
pDK14	Del2 auf pDK12 durch Mutagenese-PCR mit Primerpaar Efg1-408bp-Muta2for und Efg1-408bp-Muta2rev	diese Arbeit
pDK15	Del3 auf pDK12 durch Mutagenese-PCR mit Primerpaar Efg1-408bp-Muta 3for und Efg1-408bp-Muta3rev	diese Arbeit

2.4.2 Primer

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH bezogen. Das Lösungsvolumen der Oligonukleotide in Wasser wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 100 pmol/ µl erreicht wurde.

Primer	Sequenz
pET19Serinhin:	5`-GTATGGGTATCAATCGAATTATTACCAGGG-3`
pET19Serinher:	5`-CCCTGGTAATAATTCGATTGATACCCATAC-3`
pET-RP:	5`-CTAGTTATTGCTCAGCGG-3`
His-Efg1-FW-BamHI:	5`-CCG GGA TCC ATG GGC CAT CAT-3`
His-Efg1-RV-EcoRI:	5`-CCG GAATTC TTA CTT TTC TTC-3`
EfgCyshin:	5`-GATGAAAAAACTTTGGCTTATCAAGTTGATGCC-3`

EfgCysher: 5`-GGCATCAACTTGATAAGCCAAAGTTTTTTCATC-3`
CysSeq: 5`-GCAGTACCTATCCCACCAC-3`
T179Efor: 5´-CAATGCAACAACCAGAGCCTGTTCAGGATAC-3`
T179Erev: 5`-GTATCCTGAACAGGCTCTGGTTGTTGCATTG-3`
T206Efor:
5´-CAGACCACGAGTAGAAACTACCATGTGGGAAGATG-3`
T206Erev: 5`-CATCTTCCCACATGGTAGTTTCTACTCGTGGTCTG-3`
p-BI-1-His-Efg1seq: 5`-CGAATCAATCATTAAC-3`
408for: 5`-AGCTTTCACTACAACCTAAT-3`
408rev: 5`-CCTTCTACTACTTCTCACTC-3`
313for: 5`-ATTTCATTGTTGTTGGAATC-3`
313rev: 5`-CTTTTGGATGTTATTTATATTTC-3`
5-lacZ/raus: 5'-GCTAACAATCTTTGGATCG-3'
408XhoIfor: 5`-CGGCTCGAGAGCTTTCACTACAACCTAAT-3`
408XhoIrev: 5`-CGGCTCGAGCCTTCTACTACTTCTCACTC-3`
OH1hin: 5`-CGGCTCGAGAGTATATATGCATATA-3`
OH1her: 5`-CGGCTCGAGTGCTAATTGGTATATG-3`
3xR-Box *BglII* insert For:
5`-GAAACTAATATACAAGTATAAGATCTTACCAATTAGCAATACTGC-3`
3xR-Box *BglII* insert Rev:
5`-GCAGTATTGCTAATTGGTAAGATCTTATACTTGTATATTAGTTTC-3`
Efg1-408bp-Muta 1_for:
5`-AGCTTTCACTACAACCGCAATACTGCACAATAACA-3`
Efg1-408bp-Muta 1_rev:
5`-TGTTATTGTGCAGTATTGCGGTTGTAGTGAAAGCT-3`
Efg1-408bp-Muta 2_for:
5`-CAAGTATAAGATCTTACCGCTTATTATGCATTCAGTC-3`
Efg1-408bp-Muta 2_rev:
5`-GACTGAATGCATAATAAGC GGTAAGATCTTATACTTG-3`
Efg1-408bp-Muta 3_for:
5`-GCATTTCGTGATAAAATGGGTGAGAAGTAGTAGAAGG-3`
Efg1-408bp-Muta 3_rev:
5`-CCTTCTACTACTTCTCA CCCATTTTATCACGAAATGC-3`
408hin: 5`-AGCTTTCACTACAACC-3`
408her: 5`- CCTTCTACTACTTCTC-3`

2.5 Molekularbiologische Methoden

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* für analytische Zwecke erfolgte im kleinen Maßstab (ausgehend von 2 ml Übernachtkultur) mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen (Hilden), das auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab (ausgehend von 100 ml Übernachtkultur) erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-Kits nach dem Protokoll des Herstellers. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in dH_2O aufgenommen und konnte außer für Transformationen und Restriktionsanalysen direkt zur DNA Sequenzierung eingesetzt werden.

2.5.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*

Chromosomale DNA einer 5 ml Übernachtkultur konnte isoliert werden, indem die Kultur zunächst geerntet und in 5 ml dH_2O gewaschen wurde. Das Zellpellet wurde daraufhin in 400 µl SCE (+ 50 mM DTT + 100 µl Zymolyase 100) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Pelletieren bei 4000 Upm für 5 min wurde das Zellpellet in 500 µl 50 mM EDTA + 50 µl 10 % SDS resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 60 °C wurde die Suspension abgekühlt, 100 µl 5 M KAc pH 6,0 zugegeben und für 30-90 min auf Eis gekühlt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und mit 900 µl eiskaltem EtOH abs. versetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 Upm und 4 °C. Das Pellet wurde daraufhin in 400 µl RNAse-Lsg. (RNAse 2 mg/ml, 150 mM NaAC pH 5,9 in TE-Puffer) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion, bei der 400 µl Phenol/Chloroform zugeführt wurden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min bei 13000 Upm) wurde die obere Phase der Extraktion mit 800 µl EtOH versetzt, um die DNA über Nacht bei -20 °C zu fällen. Abschließend wurde die gefällte DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.5.3 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurden 900 ng-3 µg Plasmid-DNA und 300 pmol Oligonukleotid-DNA mit einem Endvolumen von 30 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz).

2.5.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Fragmente dabei umgekehrt proportional zu dem Logarithmus ihres Molekulargewichts ist. Je nach Größe der erwarteten Banden wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,5 % bis 1,5 % verwendet. Zur Herstellung der Agaroselösung wurde Ultra-Pure-Agarosepulver (Invitrogen) in 0,5 x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) mit 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml Agaroselösung kurz in einer Mikrowelle aufgekocht. Die Elektrophorese der mit Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versehenen Proben erfolgte bei 70–90 Volt. Die Gele wurden zur anschließenden Detektion der Banden unter UV-Licht (254 nm) fotografiert.

2.5.5 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

2.5.5.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz: $A260 \cdot \varepsilon = c$ [ng/µl]. Eine Extinktion von $E_{260}=1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA sowie 33 µg/ml Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993). Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD_{260} nm/OD_{280} nm bestimmt, der zwischen 1.8 und 2.0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen liegt der Wert unter 1.8.

2.5.5.2 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel

Nach Restriktion und Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde die Konzentration der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden durch Vergleich mit einer definierten Menge eines Größenstandards mit bekannter Konzentration abgeschätzt. Chromosomale DNA wurde im Vergleich zu bekannten Mengen ungeschnittener DNA des Bakteriophagen λ abgeschätzt.

2.5.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die direkt für Restriktionsansätze oder für Sequenzierungen bestimmt waren, wurden mit dem PCR-Purification-Kit nach Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden) gereinigt,

um Oligonukleotide und noch vorhandene Nukleotide zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Wasser eluiert.

2.5.7 Restriktionsverdau

Die Restriktion von DNA erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Es wurden Restriktionsenzyme der Firmen Roche, New England Biolabs, Gibco BRL und MBI Fermentas und die entsprechenden mitgelieferten Puffer eingesetzt.

2.5.8 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 X Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim). Dabei wurden verschiedene molare Verhältnisse von Vektor zu Insert zwischen 1:10 und 10:1 eingesetzt. Bei glatten Enden erfolgte die Ligation über Nacht bei 16 °C, bei überhängenden Enden für 2 h bei Raumtemperatur. Alternativ wurde das „Quick Ligation Kit“ (New England Biolabs) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Dazu wurden 50 ng Plasmid-DNA und die dreifache molare Menge des zu klonierenden Fragments eingesetzt.

2.5.9 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Für Klonierungsexperimente wurden linearisierte Vektoren an ihren 5’-Enden dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde 1 U alkalische Phosphatase (AP, Roche Diagnostics, Mannheim) nach der Restriktion zum Ansatz hinzugefügt und es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C. Dabei betrug die Inkubationszeit 1 h bei überhängenden Enden, bzw. 2-4 h bei glatten Enden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt und das Enzym 10 min bei 65 °C inaktiviert. Außerdem wurde eine Phenol/Chloroform–Extraktion, gefolgt von einer Ethanol–Fällung der geschnittenen und dephosporylierten DNA durchgeführt.

2.5.10 Radioaktive Markierung von DNA

Die Übertragung terminaler Phosphatgruppen eines ATP-Moleküls auf 5’-OH-Enden von DNA- oder RNA-Fragmenten wird durch eine T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert. Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurden hierzu nach Herstellerangaben in

einem 50 µl Ansatz ca. 200 fmol DNA für 30 min bei 37 °C mit 4,5 U PNK (New England Biolabs, Schwalbach) und 1,68 pmol [γ-32P]- ATP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic, Braunschweig) inkubiert. Die Aufreinigung der Reaktion zur Entfernung von ADP und nicht umgesetztem ATP erfolgte mithilfe der MobiSpin S-200 Säulen der Firma MoBi Tec.

2.5.11 Molekulargewichts- und Größenstandards

2.5.11.1 DNA-Größenstandard

λ-DNA (MBI Fermentas), welche mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI/*Hind*III geschnitten wurde, diente als Größenstandard von im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmenten. Dadurch entstanden Fragmente der folgenden Größe (bp): 24756, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125. Als weiterer Größenstandard wurde eine 1 kb Leiter (MBI-Fermentas) mit folgenden definierten Bandengrößen verwendet (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.

2.5.11.2 Protein-Größenstandard

Der PageRuler (prestained, von Fermentas) mit definierten Bandengrößen von 11, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 und 170 kDa wurde verwendet.

2.5.12 Calcofluor White-Färbung

Die Anfärbung von Zellwand und Septen von Hefezellen erfolgte durch Verwendung des Farbstoffs Calcofluor White, welcher in das Chitin der Zellwand interkaliert. Hierzu wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 2 µg/ml zu den Zellen gegeben, und die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm im Fluoreszenzmikroskop.

2.5.13 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit dem Programm Corel Photopaint 9.0 bzw. Microsoft Office Powerpoint nachbearbeitet.

2.5.14 Transformation

2.5.14.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (RbCl-Methode)

Durch eine Rubidiumchlorid-Behandlung wurde *E. coli*-Zellen die Fähigkeit verliehen freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium mit einer 5 ml Übernachtkultur von *E. coli* DH5α auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,1 angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 10–15 min auf Eis abgekühlt und danach geerntet (15 min, 3500 Upm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 20 ml RF1 (12 g/l RbCl, 9,9 g/l $MnCl_2$, 1,5 g/l $CaCl_2$, 2,9 g/l Kaliumazetat, 150 g/l Glyzerin, pH 5,8 mit 0,2 N Essigsäure eingestellt) resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 3500 Upm) wurde das Pellet in 4 ml RF2 (2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l RbCl, 11 g/l $CaCl_2$, 150 g/l Glyzerin, pH 6,8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und für 15 min wiederum auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl- und 300 µl-Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C gelagert.

Eine Überprüfung der kompetenten Zellen erfolgte durch Transformation von 100 µl kompetenter Zellen mit dem Kontrollplasmid pUC (20 ng/µl). Je 100 µl unterschiedlicher Verdünnungen wurden ausplattiert (1:1, 1:10 und 1:100) und die Anzahl der erhaltenen Transformanten bestimmt. Mit Hilfe einer Formel wurde die Kompetenz berechnet.
Formel zur Kompetenz-Berechnung:

X= Transformantenanzahl der 1:10 Verdünnung
Y= Transformantenanzahl der 1:100 Verdünnung

Z= 10 * 10 * 50 * X
W= 10 * 50 * 100 * Y

$$\text{Kompetenz} = \frac{Z + W}{2}$$

2.5.14.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zu Amplifikationszwecken von Plasmid-DNA, sowie zur Transformation von Mutagenese-PCR Produkten wurde der *E. coli*-Stamm DH5α nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983) transformiert. Hierzu wurden 100 µl der bei – 70 °C gelagerten kompetenten Zellen 5 min auf Eis aufgetaut. Ungefähr 10-100 ng DNA wurden zu der Zellsuspension

hinzugefügt. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 60 sec durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und dann zu Regenerationszwecken mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 0,5-1 h bei 37 °C und leichter Bewegung inkubiert. Die Anzucht der Transformanten erfolgte unter Selektionsdruck der entsprechenden Antibiotika auf LB-Agar über Nacht bei 37 °C.

2.5.14.3 *C. albicans*-Schnelltransformation

Um Plasmide zu transformieren wurde eine schnelle, aber nicht effiziente Methode verwendet. Hierbei wurden 200 µl einer Übernachtkultur abzentrifugiert und in 100 µl 10 x OSB-Mix (0,2 ml 1 M LiAc; 0,8 ml 50 % PEG 8000; 15 mg DTT; 25 µl Heringssperma-DNA (2 mg/ml)) aufgenommen. Die Carrier-DNA sollte vor Zugabe für 10 min bei 95 °C aufgekocht werden. Nach Zugabe von 4–6 µg der zu transformierenden DNA wurden die Zellen für 30-60 min bei 43,5 °C inkubiert. Zum Schluss wurde der Ansatz auf Selektivplatten ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.5.14.4 Transformation von *C. albicans* –Zellen nach Mitchell (2000)

Zur Transformation wurde die Methode nach Mitchell (Wilson *et al.*, 2000) verwendet. Hierzu wurde eine 50 ml YPD Hauptkultur 1:100 (500 µl) mit einer Übernachtkultur inokuliert und für 4 h bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,8 bei 30 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) wurde das Pellet mit 5 ml LATE-Puffer (0,1 M Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 0,5 ml desselben Puffers resuspendiert. Pro Transformation wurden 0,1 ml Zellen mit 25 µl Heringssperma-DNA (2 mg/ml) sowie maximal 80 µl PCR-Produkt bzw. 2-10 µg DNA versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG3350 in LATE-Puffer) zugesetzt und es folgte nach kurzem Schütteln (2 sec) eine Inkubation bei 30 °C über Nacht. Dann folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm), in 5 ml YPD resuspendiert und bei 30 °C und 110 Upm mindestens 4 h regeneriert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 3500 Upm wurde das Pellet zum Schluss in 150 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) resuspendiert und auf Selektivplatten ausplattiert.

2.5.14.5 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Li-Acetat Methode (Ito *et al*., 1983). 50 ml einer Kultur wurden bei einer OD_{600} von 0,6-1 geerntet, mit dH_20 gewaschen und in

400 µl 0,1 M LiOAc resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die Suspension wurde jeweils abzentrifugiert und das Zellpellet mit 240 µl PEG-Lösung (50 %), 36 µl Liciumacetat (1 M), 25 µl Heringssperma-DNA (4 mg/ml) und 0,1-10 µg zu transformierender Plasmid-DNA und 44 µl dH_2O resuspendiert. Jeder Ansatz wurde sorgfältig 1 min auf dem Vortex gemischt und danach für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend folgte ein 30 minütiger Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 100 µl dH_2O aufgenommen und ausplattiert. Das Wachstum der Transformanden erfolgte für 2-4 Tage bei 30 °C.

2.5.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.15.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis (1987) diente der Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen und wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Ein Standard-PCR-Ansatz enthielt eine doppelsträngige DNA-Matrize, kurze Oligonukleotide („Primer"), eine DNA-Polymerase zur Katalyse der DNA-Synthese und die vier Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Jeder PCR-Zyklus besteht aus einer DNA-Denaturierung, dem Anlagern der Oligonukleotide (Annealing) und der DNA-Kettenverlängerung (Elongation). Die Annealing-Temperatur, sowie die Elongationszeit wurden den eingesetzten Primern, bzw. dem erwarteten PCR-Fragment angepasst. Zur Amplifikation wurde entweder die *Taq*-DNA-Polymerase von NEB eingesetzt oder das „Expand™ High Fidelity"-PCR-Kit von Roche Diagnostics (Mannheim), um eine möglichst geringe Fehlerrate zu erreichen.

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Template	10 - 100 ng
dNTP Mix	200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligonukleotid vorwärts	20 pmol
Oligonukleotid rückwärts	20 pmol
10 x Puffer mit 15 mM $MgCl_2$	5 µl
H_2O	ad 50 µl
Taq-Polymerase	5 U

Tabelle 2.6: Standard-PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	95 °C	2 min
2.	95 °C	30 sec
3.	y °C	30 sec
4.	68 °C	1 min/kb
5.	68 °C	8 min

30-35 x

2.5.15.2 Mutagenese-PCR

Spezifische Punktmutationen sowie Deletionen wurden mit Hilfe des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) generiert. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren, wobei die Turbo-*Pfu*-Polymerase und ein spezielles Mutagenese-PCR Programm verwendet wurden. Zyklenanzahl und Elongationszeit wurden der Templategröße angepasst. Nach der PCR erfolgte eine Zugabe von 10 U *Dpn*I zum Reaktionsansatz und eine Inkubation bei 37 °C für 1 h, wodurch selektiv die methylierte Template-DNA abgebaut wurde. Abschließend wurde die offene einzelsträngige DNA in kompetente *E. coli*–Zellen transformiert.

Tabelle 2.7: Mutagenese-PCR Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	95 °C	30 sec
2.	95 °C	30 sec
3.	55 °C	1 min
4.	68 °C	1 min/kb
5.	68 °C	10 min

18 x

2.5.15.3 Kolonie-PCR

Nach erfolgter Transformation wurde zur Verifizierung integrierter DNA eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurde eine kleine Menge Zellmaterial einer Einzelkolonie in 40 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Die erhaltene Suspension wurde auf Eis gelagert und 4 µl dieser Suspension wurden anschließend in einer herkömmlichen

PCR (50 µl) eingesetzt. Die PCR wurde nach Herstellerangaben mit der von NEB bezogenen Taq-Polymerase angesetzt.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Zellaufschluss zur Herstellung von Proteinrohextrakten

2.6.1.1 Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle

Für den Zellaufschluss von Überexpressionskulturen von *E. coli* bzw. *C. albicans* wurde das Zellpellet in je 10 ml Aufschlusspuffer pro Liter Expressionskultur aufgenommen. Zusätzlich wurde pro 10 ml Aufschlusspuffer entweder eine Tablette Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini oder 100 µl Thermo Scientific Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA free, hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige Passage durch eine vorgekühlte French-Press-Zelle (SLMAMINCO_Spectronic Instruments, Rochester; USA) bei einem Druck von 180 MPa. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 10000 Upm, 4 °C) abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde daraufhin für die Proteinaufreinigung verwendet.

2.6.1.2 Zellaufschluss durch Ultraschall

Für den Zellaufschluss von Überexpressionskulturen von *E. coli* wurde das Zell-Pellet in je 10 ml Aufschlusspuffer pro Liter Expressionskultur aufgenommen. Zusätzlich wurde pro 10 ml Aufschlusspuffer entweder eine Tablette Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini oder 100 µl Thermo Scientific Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA frei, hinzugefügt. Ein enzymatischer Verdau von bakteriellen Zellwandkomponenten (Peptidoglykangerüst) wurde durch Zugabe von 1 mg/ml Lysozym und anschließender Inkubation für 15 min auf Eis gewährleistet. Da es bei der Ultraschall-Behandlung zu einer starken Wärmeentwicklung kommt, wurde der Zellaufschluss auf Eis vorgenommen. Die Zellsuspension wurde in 30 ml Corex-Röhrchen verteilt und der Ultraschall-leitende Metallstab wurde ca. 1 cm tief in die Zellsuspension getaucht. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch ca. 5 minütige Sonifikation (LABSONIC 4, B.Braun, Nadelsonde 40T). Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 10000 Upm, 4 °C) abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde daraufhin für die Proteinaufreinigung verwendet.

2.6.1.3 Zellaufschluss durch FastPrep Gerät

Für den Zellaufschluss von Überexpressionskulturen von *C. albicans* wurde das Zell-Pellet in je 10 ml Aufschlusspuffer pro Liter Expressionskultur aufgenommen. Zusätzlich wurde pro 10 ml Aufschlusspuffer entweder eine Tablette Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini oder 100 µl Thermo Scientific Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA frei, hinzugefügt. Für den Zellaufschluss wurde die Zellsuspension entweder in Cruel-Röhrchen oder in 15 ml Falcons aufgeteilt und jeweils mit ca. 1 Volumen Glasperlen versetzt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss in dem FastPrep Automated Homogenizer der Firma MP Biomedicals. Die Geschwindigkeit betrug 6 m/s und es wurden 6 Zyklen von jeweils 45 sek vorgenommen. Dabei wurden die Proben nach jeweils zwei erfolgten Zyklen für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer sowie Glasperlen durch Zentrifugation (10 min bei 10000 Upm, 4 °C (Cruel-Röhrchen) bzw. 10 min 4000 Upm, 4 °C (Falcons)) abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde daraufhin für die Proteinaufreinigung verwendet.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) basiert auf der Tatsache, dass das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brillant Blue G 250 nach der Interaktion mit Proteinen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Es wurden 1-15 µg Protein auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml mit dH_2O verdünnt und mit 0,2 ml „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) versetzt. Nach einer 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 595 nm in einem Beckmann-Photometer (DU 7400), wobei als Standard eine BSA-Eichkurve verwendet wurde.

2.6.3 Bestimmung der β–Galaktosidase-Aktivität

2.6.3.1 X-Gal-Overlay Assay

Zur groben und schnellen Abschätzung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde der „Overlay-Assay“ verwendet (Suckow und Hollenberg, 1998). Es wurden je 5 µl einer Übernachtkultur der verschiedenen Transformanten auf Platten mit Selektionsmedium getropft und diese 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Overlay-Lösung wurde hergestellt, indem 1 % Agarose in 10 ml dH_2O und 10 ml 1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) getrennt voneinander in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend zusammengefügt wurden. Die Lösung wurde bei 65

°C in einem Wasserbad platziert und es wurden 400 µl SDS-Lösung (10 %) zugegeben. Zu der klaren Lösung wurden anschließend 400 µl X-Gal-Lösung (40 mg/ml in DMF) hinzugefügt. Jede Platte wurde mit 10 ml dieser Lösung überschichtet und nach dem Erkalten für 2-8 h bei 37 °C inkubiert.

2.6.3.2 β–Galaktosidase Flüssigtest

Zur quantitativen Aktivitätsbestimmung der β-Galaktosidase wurde die Methode von James *et al*. (1996) verwendet. Die OD_{600} einer 5 ml Übernachtkultur wurde gemessen und 1 ml dieser Kultur abzentrifugiert (2 min, 13000 Upm). Das Zellpellet wurde in 100 µl Lyse-Puffer (0,1 M Tris/Azetat pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) aufgenommen und bei –70 °C mindestens 2 h eingefroren. Die Proben wurden bei 30 °C aufgetaut und mit 750 µl Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na_2HPO_4; 40 mM NaH_2PO_4; 10 mM KCl; 1 mM $MgSO_4$; 1 mg/ml O-Nitrophenyl-ß-D-Galactopyranosid, pH 7,0) bis zur Gelbfärbung bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M $NaCO_3$ gestoppt und die Inkubationszeit (t) in min bestimmt. Bei der Spaltung des ONPG durch die β-Galaktosidase entsteht ein gelbes Abbauprodukt, ortho-Nitrophenol, das bei einer photometrischen Bestimmung eine Extinktion bei 420 nm zeigt. Zur Ermittlung dieser Extinktion wurde die Probe, um feste Zellbestandteile abzutrennen, 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und die OD_{420} des Überstandes ermittelt und notiert. ONPG, das Substrat der β-Galaktosidase, wird im Überschuss eingesetzt, so dass die Menge des entstehenden Abbauprodukts nur abhängig von der Menge der vorhandenen β-Galaktosidase ist. Von jeder Transformante wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um die Aktivität der β-Galaktosidase in Miller-Units zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet (Golemis und Khazak, 1994; Miller, 1972):

$$(1000/t) \times (OD_{420}/OD_{600}) = y \text{ Miller-Units.}$$

2.6.4 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen über Phosphatase-Behandlung

Zum Nachweis von Phosphorylierungen wurden zunächst je 50 µg Proteinrohextrakt mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (NEB) und dem entsprechenden Puffer sowie $MnCl_2$ versetzt. Anschließend folgte eine Inkubation für 60–90 min bei 30 °C. Als Negativkontrolle wurden jeweils 50 µg Rohextrakt nur mit entsprechendem Puffer und $MnCl_2$ verwendet. Das Laufverhalten der dephosphorylierten Proteine wurde durch Auftrennung in der SDS-PAGE Apparatur von Hoefer Scientific und Verwendung von 16 cm langen, 8 % SDS-Gelen und anschließender Western-Blot-Analyse überprüft.

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine modifizierte Methode nach Laemmli (1970) verwendet. Zum Gießen von 4-12 %igen denaturierenden SDS-Gelen (Sambrook *et al.*, 1989) wurde die Apparatur von Hoefer Scientific (USA, San Francisco) verwendet. Nach dem Gießen des unteren Trenngels (0,375 M Tris (pH 8,8); 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 8-12 % Acrylamid), wurde dieses zunächst mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. einstündiger Polymerisation wurde anschließend das Sammelgel (,125 M Tris (pH 6,7), 0,1 % SDS, 0,8 % APS, 0,1 % TEMED, 5 % Acrylamid) über das Trenngel gegossen. Als Elektrophorese-Puffer diente ein Laufpuffer bestehend aus 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Alternativ wurde die XCell SureLockTM Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen mit 8-10 %igen SDS-Gelen der Firma Pierce verwendet. Hierzu wurde für den Lauf der Gele ein HEPES-Laufpuffer (100 mM Tris; 100 mM HEPES; 1 % SDS (w/v)) eingesetzt. Als Proteingrößenstandard wurde der PageRuler (prestained) von Fermentas verwendet. Sämtliche Proteinproben wurden mit 1/3 Volumen 3 x SDS-Ladepuffer versetzt und vor dem Auftragen 10-20 min bei 95 °C denaturiert. Die Anfärbung der Gele erfolgte entweder durch Coomassie- oder Silbernitratfärbung.

2.6.6 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zur Anfärbung von Proteingelen wurde die Methode nach Khang *et al.* (2002) verwendet. Hierzu wurde das Proteingel 1 h bzw. über Nacht in Coomassie-Lösung (0,02 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 2 % Phosphorsäure (w/v); 5 % Aluminiumsulfat; 10 % Ethanol (v/v)) inkubiert und anschließend für mindestens 1 h (2 % Phosphorsäure (w/v); 10 % Ethanol (v/v)) bei leichtem Schütteln entfärbt. Alternativ wurde die Bio-Safe Coomassie-Färbelösung (BIO-RAD) verwendet. Nach Waschen des Proteingels für dreimal 5 min in 100 ml dH_2O, erfolgte die Anfärbung in 50 ml Färbelösung bei leichtem Schütteln. Die Entfärbung des Gels wurde wiederum in 100 ml dH_2O vorgenommen.

2.6.7 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Silberfärbung von Proteingelen wurden diese zunächst für mindestens 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln in Fixierlösung (50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd) inkubiert. Anschließend wurde das Proteingel dreimal für 20 min in 50 % igem Ethanol gewaschen. Nach Inkubation für 1 min in 0,2 g/l Natriumthiosulfat-Pentahydrat wurde das Proteingel dreimal für je ca. 20 sek in dH_2O gewaschen und anschließend für 20

min mit Silbernitrat (0,2 g/100 ml, 75 µl Formaldehyd) angefärbt. Daraufhin erfolgten zwei weitere Waschschritte für jeweils 20 sek. Die Entwicklung des angefärbten Proteingels wurde für 1-10 min in 250 ml Entwicklerlösung (15 g Natriumcarbonat; 20 µl Natriumthiosulfat-Pentahydrat; 125 µl Formaldehyd) vorgenommen. Die Färbung der Banden wurde durch Inkubation in einer Stopplösung (50 % Methanol, 12 % Essigsäure) angehalten.

2.6.8 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran von Millipore) transferiert. Zur Aktivierung wurde diese zuvor 1 min mit Methanol behandelt. Der Transfer kleiner SDS-Gele die in einer XCell SureLockTM Mini-Cell Gelapparatur aufgetrennt wurden, erfolgte über Nacht bei 4 °C mit einer Spannung von 10 Volt bzw. für 2 h bei Raumtemperatur mit 150 Volt. SDS-Gele die in einer Apparatur von Hoefer Scientific aufgetrennt wurden, wurden in einer großen Tankblot-Kammer über Nacht bei 4 °C mit einer Spannung von 40 Volt bzw. für 2 h bei Raumtemperatur mit 80 Volt übertragen. Als Transferpuffer diente ein Puffer bestehend aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, und 20 % Methanol. Zum Absättigen potentieller unspezifischer Bindestellen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver blockiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper unter leichtem Schütteln. Hierzu wurde der Antikörper in der entsprechenden Verdünnung mit TBST-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1 % (w/w) Tween-20) verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Puffer für jeweils 10 min, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur, ebenfalls unter leichtem Schütteln. Zum Schluss wurde wiederum dreimal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der Peroxidase erfolgte durch die Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates „SuperSignal® West Dura“ (Pierce) entsprechend den Anweisungen der Hersteller und Verwendung des LAS1000.

2.6.9 Gelretardierungsexperimente

Zur Analyse der Interaktion von Efg1 mit spezifischen DNA-Sequenzen wurden diese durch PCR amplifiziert oder durch Restriktion aus einem Plasmid isoliert. Anschließend erfolgte die radioaktive Markierung mit γ-[32P]-ATP durch die T4-Polynukleotidkinase. Jeder 20 µl Bindungsansatz enthielt 2 µl 10 x Bindungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 500 mM KCl; 100 mM $MgCl_2$; 10 mM EDTA; 50 % Glycerin), 5 µl radioaktiv markierte DNA, 1 µl Poly(dI-dC) (1 mg/ml), 1 µl 20 mM DTT und verschiedene Konzentrationen des Efg1-HIS

Proteins bzw. von verschiedenen Proteinrohextrakten. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 20-30 min bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 2 µl Ladepuffer (0,1 % w/v Xylencyanol-Lösung in dH_2O) versetzt und in einem 8 % igen, nativen Polyacrylamidgel (13,3 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid; 150 µl 20 % APS; 75 µl TEMED; 2,5 ml 10 x TBE; mit dH_2O ad 50 ml) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (1 x TBE = 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 Volt für 2-3,5 h. Anschließend wurde das Gel auf 3MM-Whatman Papier für 1-2 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Die Detektion durch Autoradiogramm erfolgte nach 1-7 tägiger Inkubation des getrockneten Gels in einer Filmkassette bei -70 °C.

2.6.10 Vernetzung von Proteinen mit dem BS^3-Crosslinker

Es wurde der BS^3 (Bis [sulfosuccinimidyl] suberate, No-Weigh Format (8x2mg)) Crosslinker von Thermo Scientific verwendet. Für die Reaktion wurden ca. 500-700 ng gereinigtes Efg1 verwendet. Die Reaktion fand in 10 mM HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 9 und einem Endvolumen von 30 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Zunächst wurden 2 mg des Crosslinkers in 70 µl dH_20 aufgenommen, um eine 50 mM Stammlösung herzustellen. Eine Lagerung des Crosslinkers ist nicht möglich, daher musste vor jedem Experiment frische Stammlösung angesetzt werden. Anschließend wurden ausgehend von dieser Stammlösung mit dH_20 weitere Verdünnungen hergestellt, um Konzentrationen des Crosslinkers von 0-5 mM zu erreichen. Nach Vorlage des Crosslinkers und des Reaktionspuffers wurde zum Schluss das gereinigte Protein hinzugefügt und für 30-45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Abstoppen/Quenchen der Reaktion fand durch Zugabe von 1,5 µl 1 M Tris pH 7,5 und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde die Probe in 15 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen, für 15 min bei 95 °C aufgekocht und durch SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse untersucht.

2.6.11 Immunpräzipitation

Die Aufreinigung von Efg1 aus hergestellten Rohextrakten erfolgte durch Immunpräzipitation mit magnetischen Protein G Beads. Protein G erkennt und bindet als Bestandteil der Zellwand von *Streptococcus* Stämmen spezifisch die F_c-Anteile bestimmter Klassen von Immunglobulinen. Gebunden an magnetische Beads wird so eine Affinitätsaufreinigung von Proteinen ermöglicht. Verwendet wurden die Dynabeads Protein G der Firma Invitrogen. Zunächst wurde das gewünschte Volumen an magnetischen Beads (50 µl) dreimal mit je 500 µl Citrat-Phosphat-Puffer pH 5 mit 0,01 % Tween 20 gewaschen. Hierzu wurden die Beads jeweils in dem Puffer resuspendiert und anschließend durch Inkubation für 1 min in einem

magnetischen Reaktionsgefäß-Ständer von der Lösung abgetrennt. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte der nächste Waschschritt. Nach Zugabe von 25 µl Anti-Efg1-Antiserum, welches in 75 µl Citrat-Phosphat-Puffer pH 5 mit 0,01 % Tween 20 aufgenommen wurde, erfolgte die Bindung der Antikörper an Protein G durch Inkubation für 40 min bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler. Es folgten drei weitere Waschschritte mit jeweils 500 µl Puffer. Die eigentliche Immunpräzipitation wurde nach Zugabe von 150 µl Proteinrohextrakt (ca. 900 µg) für 1 h bei 4 °C unter Rotation vorgenommen. Anschließend wurde dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, wobei in diesem Fall die Inkubationszeit in dem magnetischen Reaktionsgefäß-Ständer 2 min betrug. Bei besonders viskosen Proben wurde die Inkubationszeit auf bis zu 3 min erhöht. Zum Schluß wurden die Beads nach Abnahme des Überstandes in 25 µl 3 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und und für 20 min bei 95 °C aufgekocht. Die Beads wurden wiederum durch Inkubation in dem magnetischen Reaktionsgefäß-Ständer abgetrennt und das Präzipitat durch SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse untersucht.

2.6.12 Gelfiltrationschromatographie von Proteinen

Bei der Gelfiltrationschromatographie handelt es sich um ein Verfahren mit welchem die relative Molekülmasse eines unbekannten Proteins ermittelt werden kann. Zur Analyse wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule von GE Healthcare benutzt. Zunächst wurde eine Standardkurve mit Proteinen einer bekannten molekularen Masse angefertigt. Die verwendeten Standardproteine wurden von der Firma Sigma (Gel Filtration Molecular Weight Markers) bezogen. Zur Kalibrierung wurden die Carbonatanhydrase aus Rinder-Erythrocyten (3 mg/ml; Molekulargewicht 29 kDa), Rinderserum-Albumin (10 mg/ml; Molekulargewicht 66 kDa), Alkoholdehydrogenase (5 mg/ml; Molekulargewicht 150 kDa), β-Amylase (4 mg/ml; Molekulargewicht 200 kDa), Apoferritin (10 mg/ml; Molekulargewicht 434 kDa) und Thyroglobulin (8 mg/ml; Molekulargewicht 669 kDa) eingesetzt. Zur Ermittlung des Ausschlussvolumens der Säule wurde zudem Blue Dextran (2 mg/ml; Molekulargewicht 2000 kDa) verwendet. Sämtliche Proben wurden entgast, steril filtriert und in einem Volumen von 500 µl auf die Säule geladen. Als Laufpuffer wurde ein entgaster und steril filtrierter Efg1-Elutionspuffer (500 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 8; 10 % Glyzerin; 0,1 % Tween 20; 250 mM Imidazol) genutzt. Die Messung wurde mit dem ÄKTAprime plus (GE Healthcare) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min durchgeführt. Während des Laufs gesammelte 200 µl Elutionsfraktionen wurden anschließend durch Western-Blot-Analyse untersucht.

2.6.13 Reinigung durch Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Die Reinigung von Efg1 wurde per Metallaffinitätschromatographie vorgenommen, wobei es sich um eine spezielle Art der Affinitätschromatographie handelt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer spezifischen, jedoch reversiblen Bindung eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Liganden. Durch eine spezifische Wechselwirkung des Zielmoleküls mit dem immobilisierten Liganden kann dieser selektiv aus einer komplexen Proteinmischung isoliert werden. Wie in Abb. 2.1 A zu erkennen ist, wurde für die Reinigung als Chelatgruppe eine Ni-NTA Matrix („HisTrap FF crude"-Säule, GE Healthcare) verwendet. Dabei interagiert das immobilisierte Ni^{2+}-Kation im Austausch gegen Wasser mit zwei Histidin-Resten des Imidazolrings des zu isolierenden Proteins. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch Waschen der Säulenmatrix mit einem Puffer mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen. Wie aus Abb. 2.1 B deutlich wird, handelt es sich bei Imidazol um eine strukturanaloge Verbindung zu Histidin, so dass durch einen Überschuss an Imidazol das Histidin kompetetiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt werden kann. Um das Efg1 in seiner aktiven Form mit einer ausgebildeten Tertiär- und Quartärstruktur zu erhalten, wurde die Reinigung nicht unter denaturierenden, sondern unter nativen Bedingungen vorgenommen. Bei den verwendeten Expressionsplasmiden erfolgte die Epitopmarkierung mit einem Decahistidin-*tag* am N-Terminus von Efg1 (Abb. 2.1 C), da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Epitopmarkierung am C-Terminus zu keiner erfolgreichen Expression von Efg1 in *E. coli* führt.

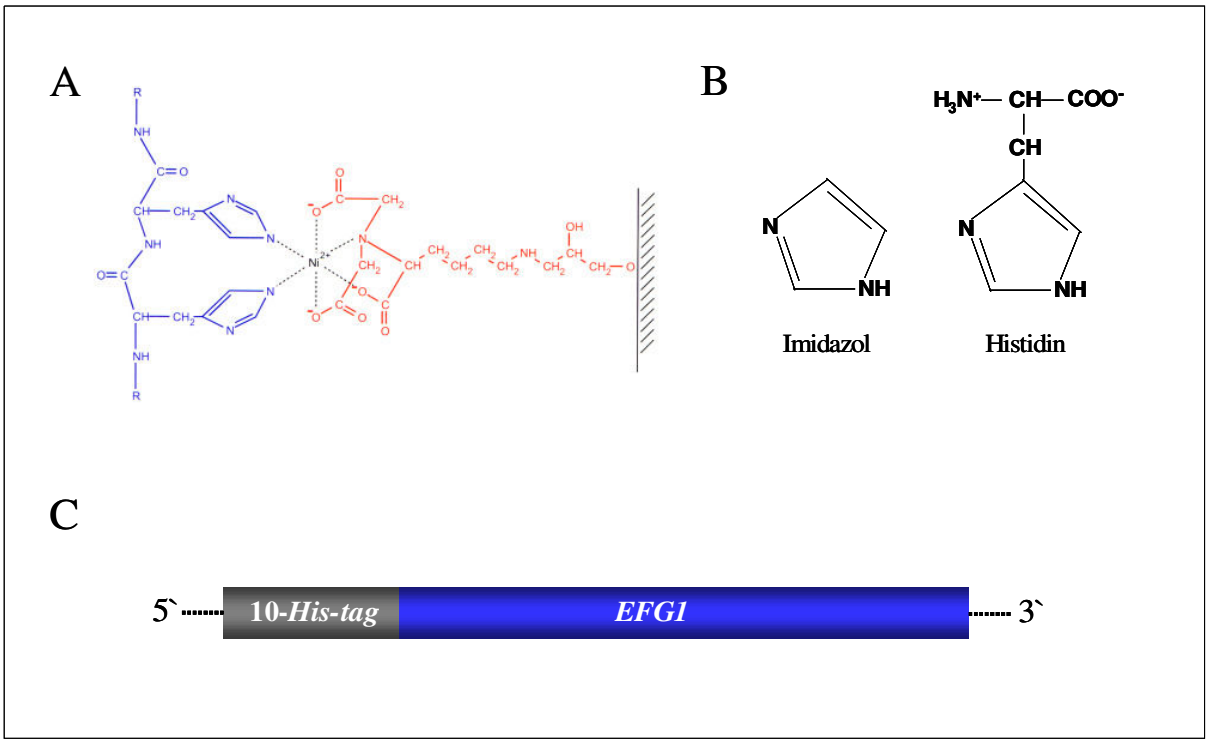


Abb. 2.1: Metallaffinitätschromatographie von Efg1. A: Interaktion zwischen Histidin-Resten eines His-getaggten Proteins und einer Ni-NTA Matrix. B: Chemische Struktur von Imidazol und Histidin. C: Schema des verwendeten Fusionskonstrukts.

2.6.13.1 Reinigung des Efg1-Proteins aus *E. coli*

Die heterologe Überexpression des *EFG1*-Gens wurde in den *E. coli* Stämmen BL21 (DE3) bzw. Rosetta 2 (DE3) pLysS vorgenommen. Hierzu wurde das Plasmid pET19-His-Efg1Kodon frisch in *E. coli* transformiert und eine Vorkultur von 20-50 ml LB-Amp (Ampicilin 100 µg/ml) bzw. LB-Amp/Cam (Ampicilin 100 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml) + 0,4 % Glukose mit dem Transformationsansatz versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur (1 l LB-Amp (BL21 (DE3)) bzw. LB-Amp/Cam (Rosetta 2 (DE3) pLysS) + 0,4 % Glucose) wurde auf eine OD_{600}=0,1 inokuliert und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600}=0,5-0,7 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Das IPTG wurde entweder in 70 % Ethanol gelöst oder in H_2O und anschließend steril filtriert. Nach weiteren 3 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 10000 Upm pelletiert. Anschließend wurde für den Zellaufschluss das Zellpellet in je 10 ml Aufschlusspuffer pro Liter Expressionskultur aufgenommen. Als Aufschlusspuffer wurde ein Puffer bestehend aus 500 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 8, 10 % Glyzerin, 0,1 % Tween 20, 20 mM Imidazol bzw. nach Pufferoptimierung ein Puffer bestehend aus 20 mM CAPSO pH 9,5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Imidazol und 0,1 % Triton-X-100 verwendet. Zusätzlich wurden pro 10 ml Aufschlusspuffer entweder eine Tablette Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini oder 100 µl Thermo Scientific Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA frei, hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige Passage durch eine vorgekühlte French-Press-Zelle (SLMAMINCO_Spectronic Instruments, Rochester; USA) bei einem Druck von 180 MPa. Alternativ erfolgte ein Zellaufschluss per Ultraschall. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 10000 Upm, 4 °C) abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde daraufhin für die Proteinaufreinigung verwendet. Die gesamte Reinigung wurde bei einer Temperatur von 4 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Zudem wurden 1 ml „HisTrap FF crude“-Säulen und der ÄKTAprime plus von GE Healthcare verwendet. Da es sich um „crude“-Säulen handelt, konnte der abzentrifugierte Rohextrakt verwendet werden und es musste keine Ultrazentrifugation vorgenommen werden. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 10 Bettvolumen (10 ml) des Aufschlusspuffers äquilibriert. Daraufhin erfolgte das Beladen der Säule mit dem Proteinrohextrakt. Es folgte ein erneutes Waschen der Säule mit dem Aufschlusspuffer (ca. 45-70 ml). Ein zweiter Waschschritt (ca. 25 ml) mit einer leicht erhöhten Imidazolkonzentration von 50 mM Imidazol im Aufschluspuffer wurde vorgenommen. Die eigentliche Elution des Proteins erfolgte durch Schlagelution mit einer hohen Imidazolkonzentration von 250 mM Imidazol im Aufschlusspuffer (ca. 25 ml). Die Konzentration der während des Laufs gesammelten 1 ml Elutionsfraktionen wurde per Bradford-Assay bestimmt und die einzelnen Fraktionen auf Anwesenheit von Efg1 durch SDS-PAGE, Western-Blot-Analyse oder Massenspektrometrie überprüft. Die Proteinlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.6.13.2 Reinigung des Efg1-Proteins aus *C. albicans*

Die Überexpression des *EFG1*-Gens wurde in dem *C. albicans* Stamm HLC67 vorgenommen. Hierzu wurde das Plasmid pBI-1-His-Efg1 in *C. albicans* transformiert. Eine Vorkultur von 20-50 ml SCAA-Medium (YNB + 4 % CASA) wurde mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hauptkultur (1-5 l SCAA-Medium) wurde auf eine OD_{600}=0,2 inokuliert und für 18-24 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 10000 Upm pelletiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch ein FastPrep Gerät (2.6.1.3) oder mittels French-Press-Zelle (2.6.1.1). Die weitere Proteinaufreinigung erfolgte analog zu dem Protokoll für die Isolierung des nativen Efg1 aus *E.coli* (2.6.13).

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung von Efg1

C. albicans wird als der bedeutendste Erreger humaner Pilzinfektionen angesehen (Hermann *et al.*, 2001). Der Transkriptionsfaktor Efg1 (Enhanced Filamentous Growth), fungiert dabei als zentraler Regulator der Morphogenese von *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997). *efg1*-Mutanten verlieren unter nahezu allen Induktionsbedingungen die Fähigkeit zur Hyphenbildung (Lo *et al.*, 1997; Stoldt und Ernst, 2000). In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte Efg1 zunächst in verschiedenen Wirtsorganismen überexprimiert werden, um es anschließend mittels Metallaffinitätschromatographie zu isolieren. Das gereinigte Protein wurde daraufhin unter anderem in Gelretardierungsexperimenten, zur Herstellung eines polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums und zur Analyse der relativen Molekülmasse von Efg1 eingesetzt. Durch diese Versuche sollten Voraussetzungen geschaffen werden, um das gereinigte Protein durch Proteinkristallisation, Massenspektroskopie und durch Interaktionsanalysen mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer zu charakterisieren.

3.1.1 Reinigung von Efg1 aus *E. coli*

3.1.1.1 Expressionsplasmid

Zur heterologen Expression von *EFG1* in *E. coli* wurde das pET-Expressionssystem genutzt. Das verwendete Plasmid pET19-His-Efg1 kodiert dabei für ein Fusionsprotein aus Efg1 mit einem N-terminalen Decahistidin-*tag*. Bei dem pET-Expressionssystem steht die Expression des Zielgens unter Kontrolle des induzierbaren *T7*-Promotors (Abb. 3.1). Zur Expression wird die T7-RNA-Polymerase benötigt, welche jedoch in prokaryotischen Zellen normalerweise nicht vorkommt. DE3 *E. coli*-Stämme verfügen daher über eine genomisch kodierte T7-RNA-

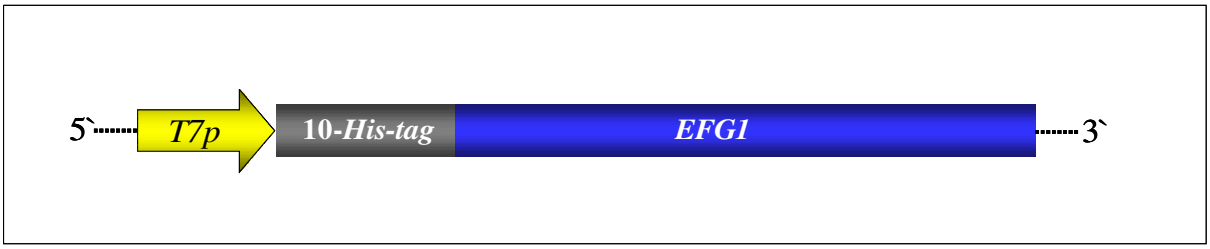


Abb. 3.1: Schema des verwendeten 10-*HisEFG1*-Fusionskonstrukts, welches zur heterologen Expression von *EFG1* in *E. coli* verwendet wurde. Die Expression des Zielgens steht dabei unter Kontrolle des induzierbaren *T7*-Promotors.

Polymerase, die unter Kontrolle des Lac-Promotors steht, welcher durch den Lac-Repressor (LacI) reprimiert wird. Das *lacI*-Gen kodiert dabei für den konstitutiv exprimierten Repressor des *lac*-Operons. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) kommt es zur Aktivierung der T7-RNA-Polymerase-Expression und folglich zur Aktivierung der Expression des Zielgens, da IPTG als ein Strukturanalogon von Laktose das Repressorprotein bindet und somit die Interaktion mit dem *lac*-Operator verhindert.

3.1.1.2 Reinigung von Efg1

Die Überexpression des *EFG1*-Gens wurde in Zellen der *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) bzw. Rosetta 2 (DE3) pLysS durchgeführt, die hierfür zunächst mit dem Plasmid pET19-His-Efg1Kodon transformiert wurden. Mit der über Nacht angezogenen Vorkultur konnte am nächsten Tag eine Hauptkultur inokuliert werden und unter Selektionsdruck bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert werden. Die Induktion der Genexpression erfolgte nach Zugabe von 1mM IPTG (Endkonzentration). Die Produktion des gewünschten Zielproteins erfolgte innerhalb einer weiteren Inkubation für 3 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Hauptkultur pelletiert und ein Zellaufschluss durch dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (2.6.1.1) oder über Zellaufschluss durch Ultraschall-Behandlung (2.6.1.2) wurde vorgenommen.

Die Reinigung von Efg1 aus der Überexpressionskultur wurde mittels Metallaffinitätschromatographie durchgeführt. Die Reinigung und Elution von Efg1 erfolgte durch Verwendung eines Puffers mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen (Stufengradient). Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Säulenmatrix zu verhindern, enthielt bereits der Aufschlusspuffer eine geringe Imidazol-Konzentration von 10–20 mM Imidazol. Nach Auftrag des Proteinrohextraktes auf die Säule wurde mit dem Aufschlusspuffer mit einer Imidazol-Konzentration von 20 mM gewaschen bis es zu einem Absinken der Absorption bei 280 nm auf das Anfangsniveau kam. Anschließend wurde ein Waschschritt mit einer Imidazol-Konzentration von 50 mM Imidazol im Aufschlusspuffer durchgeführt. Efg1 eluierte bei Verwendung des Puffers mit einer Imidazol-Konzentration von 250 mM Imidazol. Während des Laufs wurde das Eluat in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Abb. 3.2 A zeigt ein typisches Chromatogramm einer Efg1-Reinigung aus *E. coli*. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde diese bis zu ihrer weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Zudem erfolgte eine Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE (Abb. 3.2 B). Wie zu erkennen ist, zeigen die Elutionsfraktionen eine deutliche Bande auf der Laufhöhe von Efg1. Außerdem sind keine weiteren Banden in den Elutionsfraktionen zu erkennen, was darauf hindeutet, dass das Efg1 in einer reinen Form ohne Verunreinigung durch weitere Proteine vorliegt. Über Massenspektrometrie (peptide mass fingerprinting (PMF), ZMMK, Köln, Daten siehe Anhang)

der Coomassie gefärbten Bande in einem SDS-Gel konnte ebenfalls bestätigt werden, dass es sich bei dem Protein um Efg1 handelt. Die Gesamtausbeute an gereinigtem Efg1 betrug 3-4 mg Protein/l Kulturvolumen.

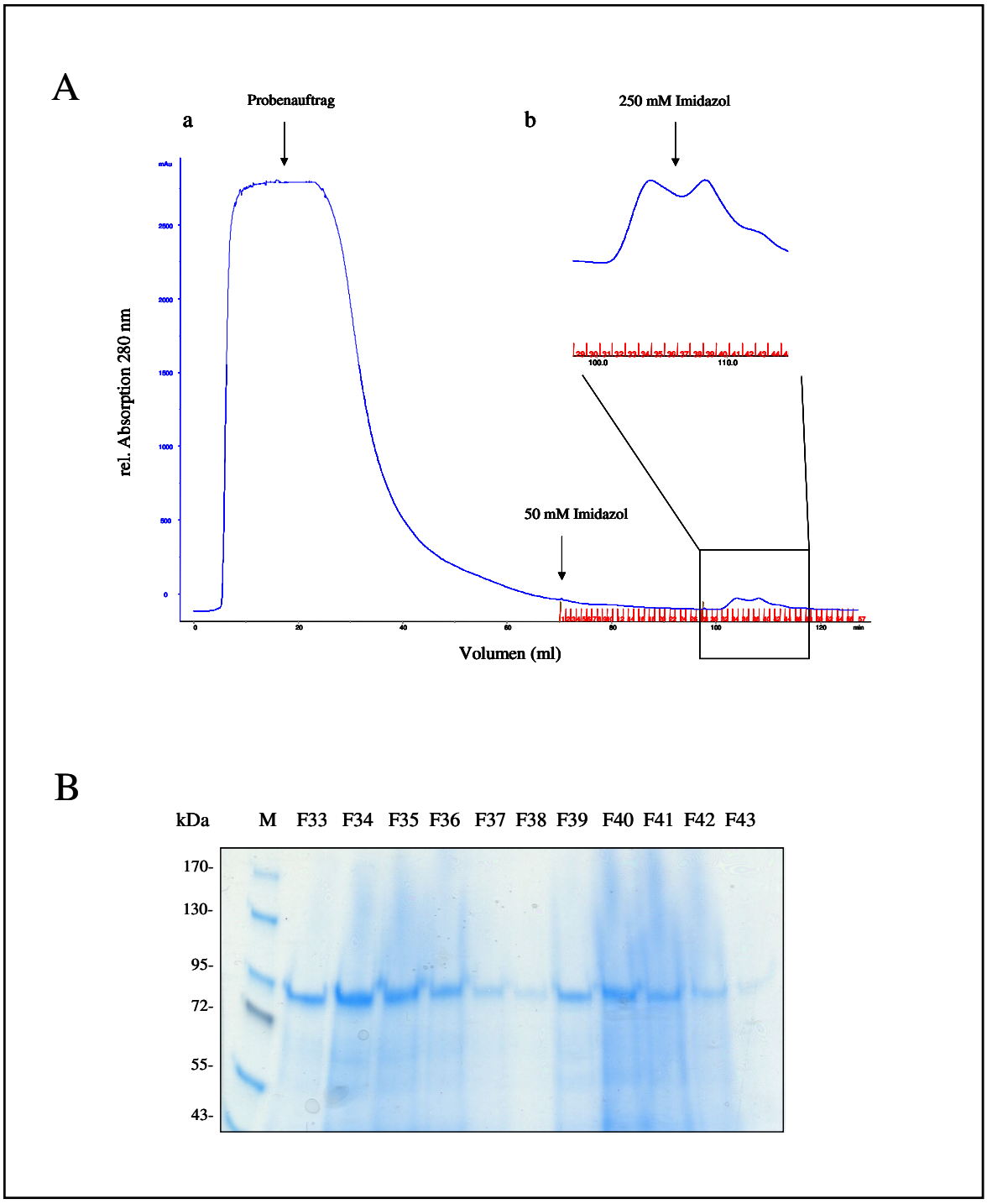


Abb. 3.2: Reinigung von Efg1 aus *E. coli*. A, a: Chromatogramm. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug jeweils 1 ml. A, b: Vergrößerte Ansicht der Elutionsfraktionen die Efg1 enthielten und bei einer Imidazol-Konzentration von 250 mM Imidazol eluiert wurden. B: SDS-PAGE Analyse von ausgewählten Elutionsfraktionen F33-F43. Es wurden 25 µl jeder Elutionsfraktion aufgetragen. Das SDS-Gel wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen. Es wurde der PageRuler prestained (Fermentas) als Größenstandard verwendet.

3.1.1.3 Anpassung des *E. coli*-Expressionsplasmids an den Kodongebrauch von *C. albicans*

C. albicans verfügt über einen ungewöhnlichen Kodongebrauch. So wird nach dem universellen genetischen Code das Kodon CUG in die Aminosäure Leucin übersetzt. In *C. albicans* hingegen kodiert das CUG-Kodon während der Proteinbiosynthese für die Aminosäure Serin. Um die Gensequenz des *E. coli*-Expressionsplasmids pET19-His-Efg1 an den ungewöhnlichen Kodongebrauch von *C. albicans* anzupassen, wurde durch Mutagenese-PCR das einzige CTG-Kodon (Leucin) an Position 449 gegen ein TCG-Kodon (Serin) ausgetauscht. Für die Mutagenese-PCR wurden die Primer pET19Serinhin und pET19Serinher verwendet. Der korrekte Austausch wurde durch Sequenzierung mit dem Primer pET-RP überprüft (GATC Biotech AG, Daten nicht gezeigt). Das so generierte Plasmid wurde pET19-His-Efg1Kodon benannt. Abb. 3.3 zeigt einen Ausschnitt der DNA- und Peptid-Sequenz des *E. coli*-Expressionsplasmids. Die Position des auszutauschenden Kodons und die entsprechenden Mutagenese-Primer sind dargestellt.

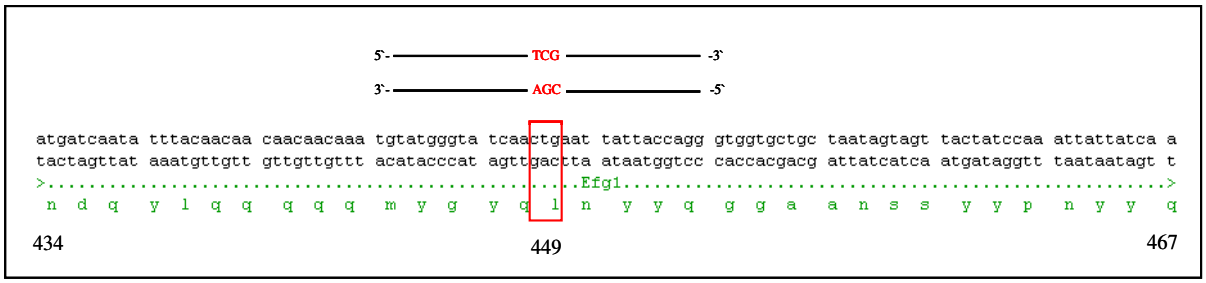


Abb. 3.3: Ausschnitt der DNA- und Peptid-Sequenz des *E. coli*-Expressonsplasmids pET19-His-Efg1. Die Plasmidsequenz wurde an den ungewöhnlichen Kodongebrauch von *C. albicans* angepasst. Die ursprüngliche DNA-Sequenz ist in schwarz dargestellt, die dazugehörige Peptid-Sequenz in grün. Rot umrandet ist das auszutauschende CTG-Kodon dargestellt. Position und Sequenz der Mutagenese-Primer sind schematisch dargestellt.

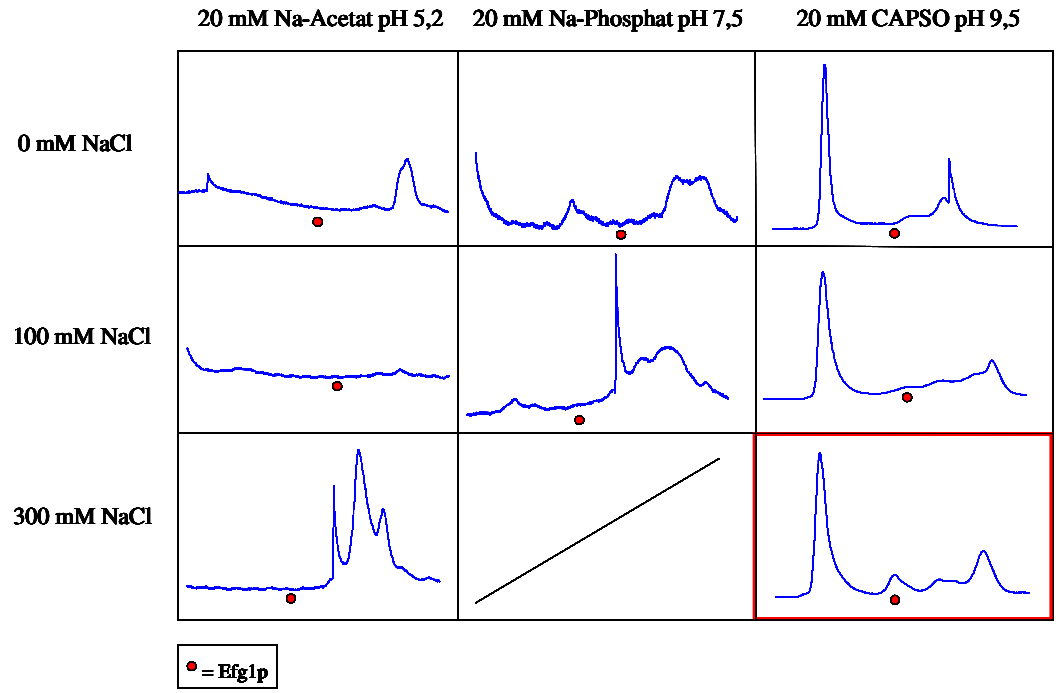
3.1.1.4 Erhöhung der Proteinstabilität durch Puffer-Optimierung

Die Reinigung von Efg1 durch Metallaffinitätschromatographie war erfolgreich, jedoch ergab sich ein Problem in der längerfristigen Lagerung des Proteins. Für eine mikroskopische Analyse bzw. eine Analyse durch SDS-PAGE wurden Efg1-Proben für mehrere Tage bei unterschiedlichen Temperaturen (25 °C, 4 °C, - 20 °C) gelagert. Die Analyse der Proben ergab, dass das Protein bei höheren Temperaturen zur Proteindegradierung und bei niedrigeren Temperaturen zur Aggregatbildung neigte (Nguena, 2008). Daher sollte der Puffer für den Aufschluss und die Lagerung von Efg1 optimiert werden, um eine höhere Proteinstabilität zu erreichen. Die Strategie, mit der nach einem optimierten Puffer gesucht wurde, basiert auf der Durchführung von analytischen Gelfiltrationschromatographien. Für

den Screen wurden verschiedene Puffer (20 mM Na-Acetat, 20 mM Na-Phosphat, 20 mM CAPSO) mit pH-Werten von 5,2 bis 9,5 ausgewählt. Zudem wurden verschiedene Salzkonzentrationen in einem Bereich von 0 bis 300 mM NaCl getestet. Insgesamt wurden so acht Puffer einer unterschiedlichen Zusammensetzung im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Efg1-Proteinstabilität getestet. Zunächst erfolgte die Reinigung von Efg1 aus 1 l E. coli-Kultur. Für diese Reinigung wurde ein Minimalpuffer bestehend aus 50 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol verwendet. Nach erfolgter Reinigung wurden die Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE analysiert und sämtliche Efg1-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Insgesamt konnten 2,5 mg Efg1 isoliert werden. Das gereinigte Protein wurde in acht Teile aliquotiert und über Nacht unter leichtem Rühren bei 4 °C gegen jeweils 1 l der zu untersuchenden Puffer dialysiert (Slide-A-Lyzer Dialysekassetten, Pierce). Am nächsten Tag wurden sämtliche Proben mit dem entsprechenden Puffer auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt und für 8–9 Tage bei – 20 °C gelagert. Anschließend wurde mit 500 µl (ca. 50 µg Efg1) jeder Probe eine Gelfiltrationschromatographie (2.6.12) durchgeführt. Vor jedem Lauf musste die Superdex 200 10/300 GL Säule mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert werden. Die Position, an der das stabile Efg1 von der Säule eluiert, wurde durch Gelfiltrationschromatographie und Western-Blot-Analyse einer Efg1-Probe unmittelbar nach erfolgter Reinigung ermittelt.

Die Chromatogramme (Abb. 3.4) der durchgeführten analytischen Gelfiltrationschromatographien zeigten deutliche Unterschiede in ihrem Profil, so dass der Effekt der einzelnen Puffer auf die Efg1-Proteinstabilität direkt beobachtet werden kann. Es ist zu erkennen, dass die Puffer mit niedrigeren pH-Werten von 5,2 und 7,5 unabhängig von der NaCl-Konzentration kein Signal an der Efg1-Position aufweisen. Betrachtet man jedoch die Chromatogramme des CAPSO-Puffers mit einem pH-Wert von 9,5, so kann mit ansteigender NaCl-Konzentration ein deutlicher Efg1-Peak beobachtet werden. Dabei ergibt sich bei der höchsten NaCl-Konzentration von 300 mM NaCl das größte Efg1-Signal. Folglich kann daraus geschlossen werden, dass Efg1 bei niedrigeren pH-Werten instabil vorliegt und es vermutlich zu einer Proteindegradierung kommt. Ein höherer pH-Wert mit einer hohen NaCl-Konzentration hingegen stabilisiert das Efg1. Eine Analyse weiterer Puffer-Zusätze wurde basierend auf dem 20 mM CAPSO-Puffer mit einem pH-Wert von 9,5 und einer NaCl-Konzentration von 300 mM durchgeführt. Es wurde nach der gleichen Methode wie bei der Ermittlung des pH-Wertes vorgegangen, wobei die Dialyse diesmal gegen den ermittelten 20 mM CAPSO-Puffer pH 9,5, 300 mM NaCl zuzüglich des zu untersuchenden Zusatzes durchgeführt wurde. Die Tabelle in Abb. 3.4 B zeigt eine Aufstellung der untersuchten Puffer-Zusätze und deren positiven oder negativen Effekt auf die Efg1-Proteinstabilität. Bei dem resultierenden optimalen Puffer zur Reinigung und Aufbewahrung des Efg1-Proteins handelt es sich somit um einen 20 mM CAPSO Puffer pH 9,5 welcher, 1 M NaCl, 1 mM EDTA und 0,1 % Triton-X-100 enthält.

A



B

0,1 % Tween 20	-
5 mM $MgCl_2$	-
20 % Glyzerin	-
500 mM NaCl	-
1 M NaCl	+
10 mM β-Mercaptoethanol	-
0,1 % Triton-X-100	+
1 mM EDTA	+

\+ = erhöhte Proteinstabilität

\- = erniedrigte Proteinstabilität

Abb. 3.4: Puffer-Optimierung zur Erhöhung der Proteinstabilität. A: Gelfiltrationschromatogramme von Efg1 mit acht unterschiedlichen Puffern. Sämtliche Proben wurden zuvor für 8–9 Tage bei – 20 °C gelagert. Der rote Punkt verdeutlicht die Position, an der das Efg1 von der Säule eluiert. Rot umrandet ist die Pufferkombination mit dem größten Efg1-Signal. B: Auflistung unterschiedlicher Puffer-Zusätze. (+) deutet einen positiven Effekt auf die Proteinstabilität an und (-) einen negativen Effekt.

3.1.1.5 Erhöhung der Proteinausbeute durch Verwendung von *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS

Eine Analyse des *E. coli* Kodongebrauchs ergab, dass die Sequenz von *His-EFG1* Kodons enthält, die in *E. coli* nur selten vorkommen. Dadurch könnte die Translation von Efg1 in *E. coli* aufgrund selten vorkommender tRNAs eingeschränkt sein. Um dies zu untersuchen, wurde ein Vergleich der Proteinausbeuten der *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und Rosetta 2 (DE3) pLysS durchgeführt. Der Stamm Rosetta 2 (DE3) pLysS besitzt auf dem zusätzlichen Plasmid pRARE2 (Chloramphenicol-Resistenz) tRNAs für die sieben selten in *E. coli* vorkommenden Kodons ATA, AGG, AGA, CTA, CCC, GGA und CGG. Außerdem enthält das Plasmid die kodierende Sequenz für das T7-Lysozym. Dieses Lysozym bindet an die T7-RNA-Polymerase und führt so zu einer Hemmung der basalen Expression vor IPTG-Induktion. Für die Analyse wurde Efg1 aus jeweils 1l Kultur jedes Stammes wie in 2.6.13.1 beschrieben gereinigt. Zudem wurden vor, 1, 2 und 3 h nach IPTG-Induktion Proben entnommen. Das Zellpellet einer OD_{600}=0,15 wurde in SDS-Ladepuffer aufgekocht und durch SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.5 A). Anhand der Chromatogramme der Reinigungen wurde ein Vergleich der Integrale der Elutionspeaks durchgeführt. Für den Stamm BL21 (DE3) ergab sich ein Wert von 479 mAU*ml und für Rosetta 2 (DE3) pLysS ein Wert von 607 mAU*ml. Somit ist der Flächeninhalt des Rosetta 2 (DE3) pLysS-Elutionspeaks 26,7 % größer im Vergleich zu BL21 (DE3). Dieser Wert konnte auch durch einen Vergleich der Proteinausbeuten (Abb. 3.5 B) bestätigt werden. Insgesamt konnten aus BL21 (DE3) 3,25 mg/l Efg1 und aus Rosetta 2 (DE3) pLysS 4,15 mg/l Efg1 gereinigt werden. Dies entspricht einer Differenz von 27,7 %. In Hinblick auf eine hohe Proteinausbeute scheint daher der *E. coli*-Stamm Rosetta 2 (DE3) pLysS für die Expression und Reinigung von Efg1 besser geeignet zu sein. Betrachtet man zudem in Abb. 3.5 A die Expression von Efg1 vor IPTG-Induktion so kann festgestellt werden, dass in Rosetta 2 (DE3) pLysS die basale Expression vor Induktion im Vergleich zu BL21 (DE3) stärker gehemmt wird. Auch dies spricht für die Verwendung von Rosetta 2 (DE3) pLysS.

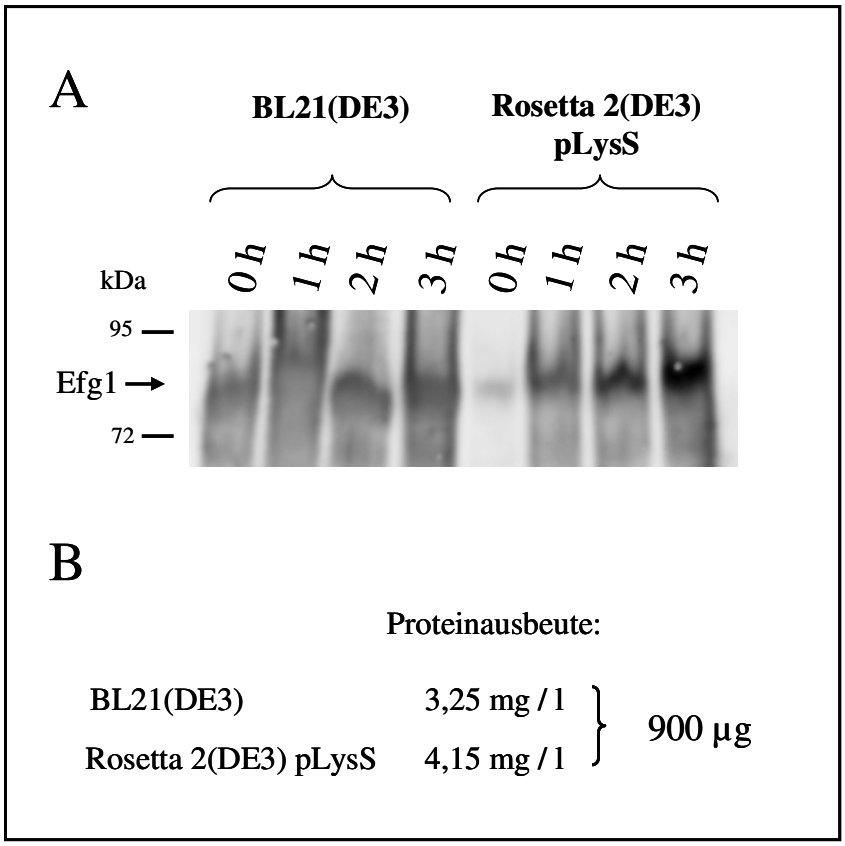


Abb. 3.5: Analyse unterschiedlicher *E. coli*-Expressionsstämme zur Erhöhung der Proteinausbeute. A: Western-Blot-Analyse (8 % SDS-Gel) der Expression von Efg1 in *E. coli* vor, 1, 2 und 3 h nach IPTG-Induktion. Es wurden jeweils Zellen einer OD_{600}=0,15 eingesetzt. Es wurde der PageRuler prestained (Fermentas) als Größenstandard verwendet. B: Vergleich der Proteinausbeuten von *E. coli* BL21 (DE3) und Rosetta 2 (DE3) pLysS.

3.1.2 Reinigung von Efg1 aus *S. cerevisiae*

3.1.2.1 Expressionsplasmid

Das Plasmid p426-Gal1 enthält den *GAL1*-Promotor, welcher für die Expression von *His-EFG1* geeignet ist, da er nativ in *S. cerevisiae* vorkommt und stark exprimiert wird. Das *GAL1*-Gen kodiert für die Galaktokinase, welche eine Phosphorylierung von Galaktose im Galaktose-Katabolismus durchführt. Das so gebildete Galaktose-1-Phosphat kann dann in die Glykolyse eingeschleust werden. Da bei Anwesenheit von Glukose als Kohlenstoffquelle Galaktose nicht verwertet wird, kommt es zu einer Repression des *GAL1*-Promotors bei Anwesenheit von Glukose im Medium. Für die Klonierung des *S. cerevisiae*-Expressionsplasmids (Abb. 3.6) wurde zunächst die für *His-EFG1* kodierende Sequenz mit den Primern His-Efg1-FW-BamHI und His-Efg1-RV-EcoRI aus dem *E. coli*-Expressionsplasmid pET19-His-Efg1 amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass bei der Amplifikation an den Enden des Fragments *Bam*HI und *Eco*RI

Schnittstellen eingefügt wurden. Anschließend wurde das erhaltene PCR-Fragment in den Hilfsvektor pGEM-T zwischenkloniert, aus welchem es durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI wieder isoliert wurde. Parallel dazu wurde das *S. cerevisiae*-Plasmid p426-Gal1 ebenfalls einer Restriktion mit diesen Enzymen unterzogen.

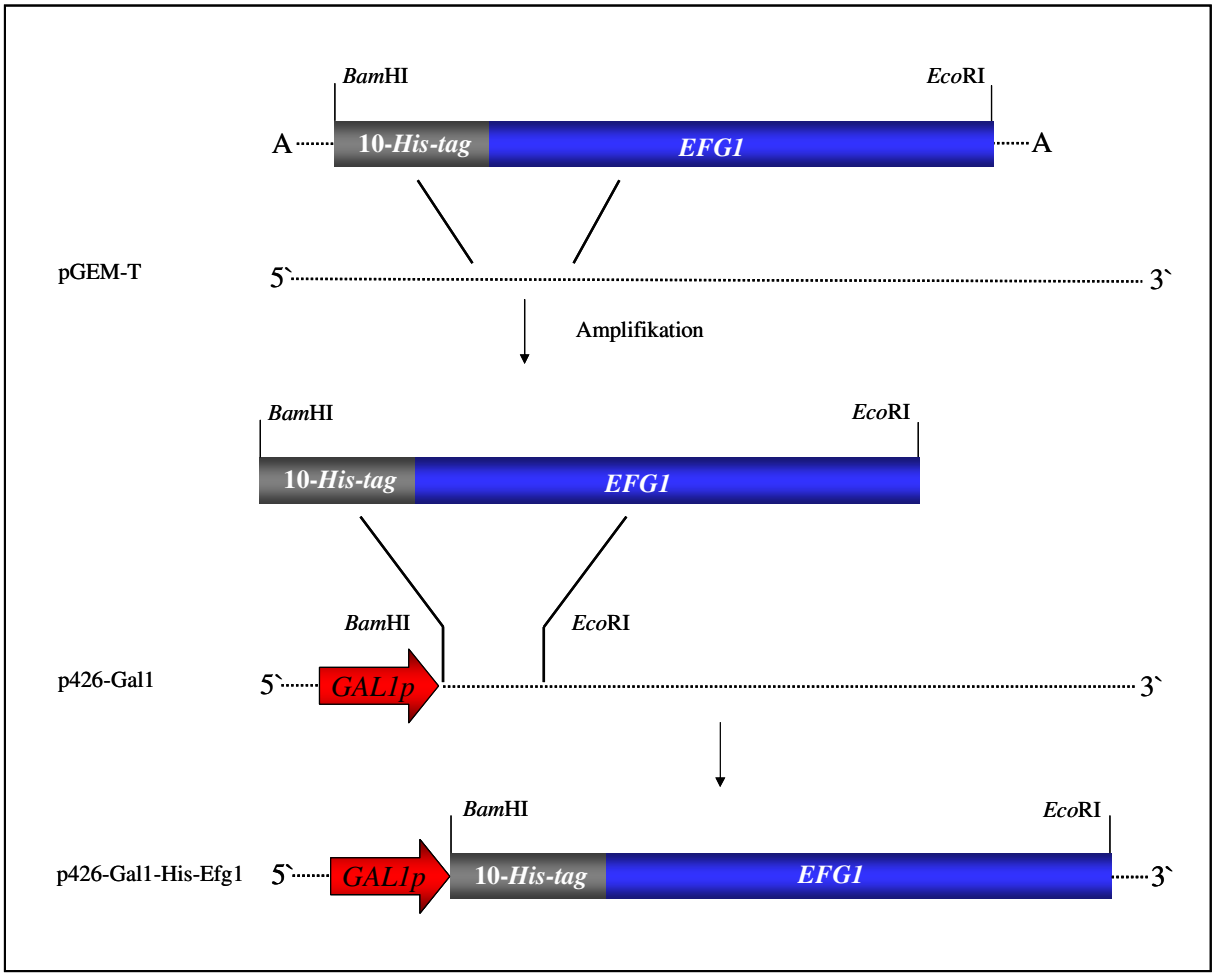


Abb. 3.6: Klonierungsschema zur Fusion von *His-EFG1* mit dem *GAL1p* zur Generation des Plasmides p426-Gal1-His-Efg1. Dargestellt ist jeweils nur ein Ausschnitt der verwendeten Plasmide. Nach erfolgter Ligation wurde das Plasmid p426-Gal1-His-Efg1 in den *S. cerevisiae* Stamm RC1695 transformiert (RC1695[p426-Gal1-His-Efg1]).

Nach Ligation von p426-Gal1 mit dem PCR-Fragment wurde das erhaltene Konstrukt in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert. Das Plasmid wurde isoliert und es wurden zwei unterschiedliche Test-Restriktionen zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durchgeführt. Das so entstandene *S. cerevisiae*-Expressionsplasmid wurde p426-Gal1-His-Efg1 benannt.

3.1.2.2 Reinigung von Efg1

Die Expression von Efg1 sollte durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Hierzu wurden p426-Gal1-His-Efg1 und das entsprechende Leerplasmid p426-Gal1 in den *S. cerevisiae*-Stamm RC1695 transformiert (RC1695[p426-Gal1-His-Efg1] und RC1695[p426-Gal1]). Zur Herstellung von Proteinrohextrakten wurde die Kultur nach Test unterschiedlicher Selektivmedien in YP-Medium mit 2 % Galaktose und 0,1 % Glukose bis zu einer OD_{600} von 0,6–0,8 angezogen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Schütteln mit Glasbeads (6 x 45 sek) in einem FastPrep-Gerät (2.6.1.3). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen Bradford-Assay wurden ca. 40 µg Rohextrakt per SDS-PAGE auf einem 8 %-SDS-Gel aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse detektiert (Abb. 3.7). Durch Vergleich mit der Positivkontrolle (250 ng aus *E. coli* isoliertes Efg1) konnte nachgewiesen werden, dass Efg1 erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert wurde. Wie erwartet zeigten Transformanten mit dem entsprechenden Leerplasmid kein Efg1-Signal. Somit eignet sich das konstruierte Plasmid p426-Gal1-His-Efg1 für die Produktion von Efg1 in *S. cerevisiae*. Die Funktionalität des gebildeten Efg1 konnte zudem durch die Komplementation der *S. cerevisiae sok2*-Mutante Y1162 bestätigt werden. Bei Efg1 handelt es sich um ein funktionelles Homolog zu Sok2, da Shenhar *et al*. nachwiesen, dass Efg1 an ein 32 bp Sok2-Zielfragment bindet und dort den transkriptionellen Aktivator Ime1 reprimiert (Shenhar *et al*., 2001). Im Gegensatz hierzu, zeigte sich in den von uns durchgeführten Versuchen die Funktionalität des von Plasmid p426-Gal1-His-Efg1 kodierten Efg1 in einer Aktivierung des Zielpromotors (Daten nicht gezeigt).

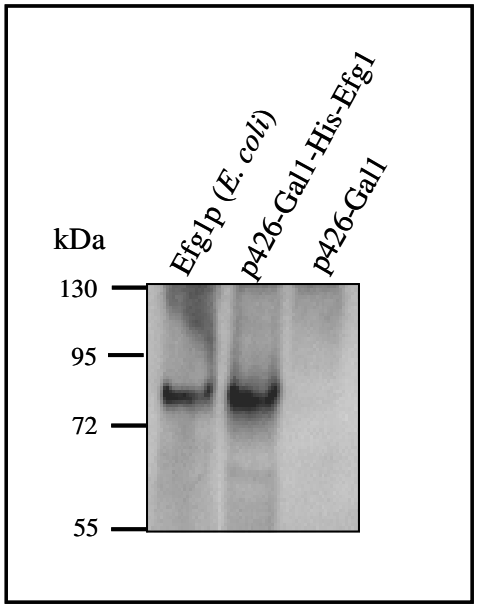


Abb. 3.7: Western-Blot-Analyse (8 % SDS-Gel) der Expression von Efg1 in *S. cerevisiae* durch das Plasmid p426-Gal1-His-Efg1. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Leerplasmid p426-Gal1 verwendet. Es wurden jeweils 40 µg Rohextrakt eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden ca. 250 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1 eingesetzt. Es wurde der PageRuler prestained (Fermentas) als Größenstandard verwendet.

3.1.3 Reinigung von Efg1 aus *C. albicans*

3.1.3.1 Expressionsplasmid

Für die Reinigung von Efg1 aus *C. albicans* wurde das Plasmid pBI-1-His-Efg1, welches in den *C. albicans*-Stamm HLC67 transformiert wurde, verwendet (HLC67[pBI-1-His-Efg1]). Bei dem verwendeten Plasmid steht die Expression des Zielgens unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors (Abb. 3.8). *PCK1* kodiert für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, welche eine wichtige Rolle bei der Glukoneogenese spielt und durch Anwesenheit von Glukose reprimiert wird. Daneben enthält das Plasmid das Ca*URA3*-und das Ca*LEU2*-Markergen sowie das bakterielle Ampicillin-Resistenzgen.

Abb. 3.8: Schema des verwendeten 10-*HisEFG1*-Fusionskonstrukts, welches zur Expression von *EFG1* in *C. albicans* verwendet wurde. Die Expression des Zielgens steht dabei unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors.

3.1.3.2 Reinigung von Efg1

Die Hauptkultur wurde für 18-24 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und mittels French-Press-Zelle (2.6.1.1) oder durch FastPrep (2.6.1.3) aufgeschlossen. Die Proteinaufreinigung wurde durch Metallaffinitätschromatographie wie in 2.6.13.2 beschrieben durchgeführt. In Abb. 3.9 A (a) ist das Chromatogramm der Reinigung von Efg1 aus *C. albicans* und in Abb. 3.9 A (b) sind in einer vergrößerten Ansicht die Elutions-Peaks dargestellt. Vergleicht man die Elutions-Peaks mit den dazugehörigen Fraktionen der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.9 B) so wird deutlich, dass bei einer Imidazol-Konzentration von 250 mM Efg1 von der Säule eluiert. Allerdings kann bereits bei einer geringeren Imidazol-Konzentration von 50 mM eine geringe Elution von Efg1 beobachtet werden. Die Größe des Elutions-Peaks bei 50 mM Imidazol im Vergleich zum Elutions-Peak bei 250 mM Imidazol lässt vermuten, dass bei dieser Konzentration unspezifisch gebundene Proteine von der Säule eluiert werden. Eventuell könnte für einen ersten Waschschritt noch eine etwas geringere Imidazolkonzentration als 50 mM gewählt werden. Allerdings wäre dann nicht mehr gewährleistet, ob sämtliche unspezifisch gebundenen Proteine eluiert werden. Insgesamt war es möglich, aus einer 4 l *Candida*-Expressionskultur 2 mg Efg1 zu reinigen.

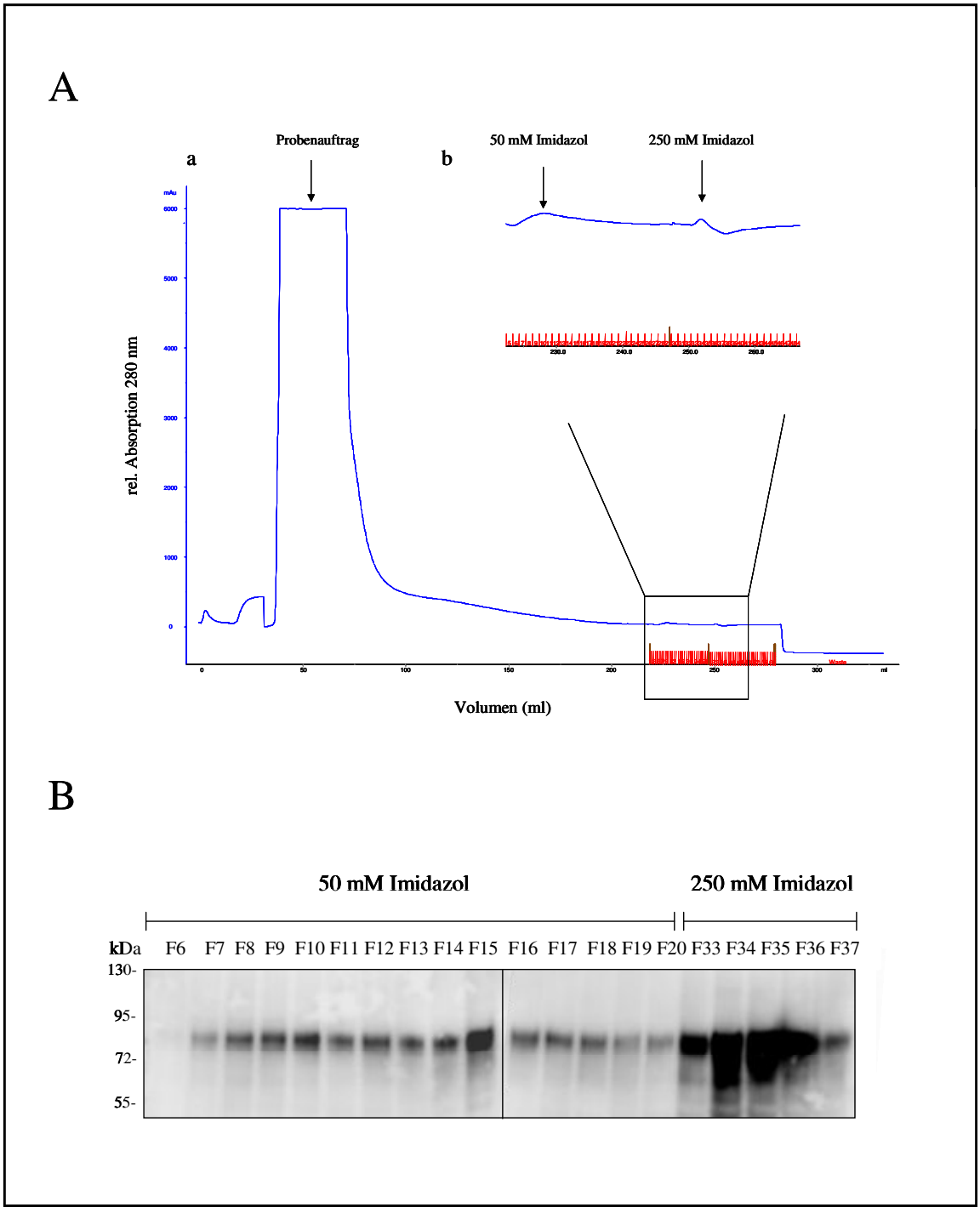


Abb. 3.9: Reinigung von Efg1 aus *C. albicans*. A, a: Chromatogramm. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug jeweils 1ml. A, b: Vergrößerte Ansicht der Elutionsfraktionen, die bei einer Imidazol-Konzentration von 50 bzw. 250 mM Imidazol eluiert wurden. B: Western-Blot-Analyse (8 % SDS-Gel) von ausgewählten Elutionsfraktionen F6-F20 (50 mM Imidazol) und F33-F37 (250 mM Imidazol). Es wurden 15 µl jeder Elutionsfraktion aufgetragen. Es wurde der PageRuler prestained (Fermentas) als Größenstandard verwendet.

3.2 Herstellung eines polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums

Für die Detektion von Efg1 konnten bisher nur epitopmarkierte Varianten von Efg1 mit den entsprechenden Antikörpern verwendet werden. Da eine Epitopmarkierung allerdings die Funktion eines Proteins beeinflussen kann (siehe 3.5.2), wurde das aus *E. coli* gereinigte Efg1 zur Herstellung eines polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums verwendet.

3.2.1 Immunisierung und Serumgewinnung

Für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums wurde Efg1 heterolog in *E. coli* produziert und anschließend durch Metallaffinitätschromatographie gereinigt (2.6.13). Die Immunisierung sowie die Serumgewinnung wurden von der Firma Eurogentec aus Belgien vorgenommen. Die Immunisierung wurde mehrfach wiederholt, um die Konzentration der spezifischen Antikörper zu erhöhen, wobei jeweils pro Boost 100 µg Efg1-Antigen eingesetzt wurden. Tabelle 3.1 zeigt die genauen Daten der einzelnen vorgenommenen Immunisierungsschritte und die Daten der Blutentnahmen. Als Antikörper-Produzenten wurden Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbit“ eingesetzt.

Durchgeführte Immunisierungen:		
Grundimmunisierung	21.07.2008	Tag 1
Erste Boosterung	04.08.2008	Tag 14
Zweite Boosterung	18.08.2008	Tag 28
Dritte Boosterung	15.09.2008	Tag 56
Durchgeführte Blutungen:		
Entnahme Präimmunserum	21.07.2008	Tag 1
Erste Blutung	28.08.2008	Tag 38
Zweite Blutung	25.09.2008	Tag 66
Finale Blutung	16.10.2008	Tag 87

Tab. 3.1: Programm für die Immunisierung von 2 Kaninchen zur Herstellung eines polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums. Die Daten der einzelnen durchgeführten Immunisierungen (Boost) bzw. die Daten der Blutentnahmen sind aufgelistet.

Vor Beginn der Grundimmunisierung wurde zunächst das Präimmunserum von 5 Kaninchen auf einen bisherigen Kontakt mit *E. coli*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* getestet. Hierzu wurden je 50 µg aus den einzelnen Organismen gewonnene Rohextrakte durch SDS-PAGE

aufgetrennt und anschließend durch Western-Blot-Analyse mit dem Präimmunserum untersucht. Das Präimmunserum wurde in den Verdünnungen 1:500 und 1:5000 getestet. Zusätzlich wurde eine Ponceau-Rot-Färbung der Western-Blot-Membran vorgenommen, um zu gewährleisten, dass exakt gleiche Proteinmengen für die Analyse verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Nach Auswertung der Analyse wurden zwei Kaninchen (SA6202 und SA6203) für die weitere Immunisierung ausgewählt. Insgesamt konnte bei allen Kaninchen ein bisheriger Kontakt mit *E. coli*-Proteinen beobachtet werden. Bei *S. cerevisiae* und *C. albicans*-Rohextrakten konnten nur vereinzelt Signale festgestellt werden. Anschließend erfolgte die Immunisierung, wobei das Antigen beiden Tieren eingespritzt wurde.

3.2.2 Antiserum-Analyse mittels ELISA

Zur Quantifizierung der im Serum vorhandenen Antikörper wurde von der Firma Eurogentec ein ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay) vorgenommen (Abb. 3.10). Der Test wurde mit dem Serum der finalen Blutung der beiden Kaninchen SA6202 und SA6203 durchgeführt. In einer Mikrotiterplatte wurden hierzu 100 ng Efg1 in PBS für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Absättigung erfolgte durch Inkubation für 2 h bei 25 °C mit BSA (1 mg/ml). Danach wurden Verdünnungsreihen des zu testenden Serums angefertigt. Es wurden die Verdünnungen 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900 und 1:218700 in Doppelbestimmung untersucht. Die Inkubation mit der jeweiligen Verdünnung erfolgte für 2 h bei 25 °C und mit einem anti-RABBIT-IgG-HRP-Konjugat (Sigma) als Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2500) wurde für weitere 2 h bei 25 °C inkubiert. Als Substrat für die Nachweisreaktion wurde OPD (ortho-Phenylendiamin) in einer Konzentration von 4 mg/ml eingesetzt und für 30 min bei 25 °C inkubiert, worauf die Reaktion durch Zugabe von 4 M H_2SO_4 abgestoppt wurde und die Farbentwicklung bei einer Wellenlänge von 492 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer bestimmt wurde. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass lediglich das Kaninchen SA6203, spezifische Antikörper gegen Efg1 gebildet hatte. Im Vergleich zeigte SA6202 selbst bei einer Verdünnung von 1:100 nur einen sehr geringen Wert. Dieses Ergebnis konnte auch durch Western-Blot-Analyse des Serums der ersten Blutung beider Kaninchen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), da auch hierbei SA6203 aber nicht SA6202 neben unspezifischen Hintergrundbanden eine spezifische Efg1-Bande zeigte. In sämtlichen weiteren Analysen wurde daher das Antiserum von Kaninchen SA6203 verwendet und für Western-Blot-Analysen in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-RABBIT-IgG-HRP-Konjugat (Jackson Immunologie Research Lab. Inc.) in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

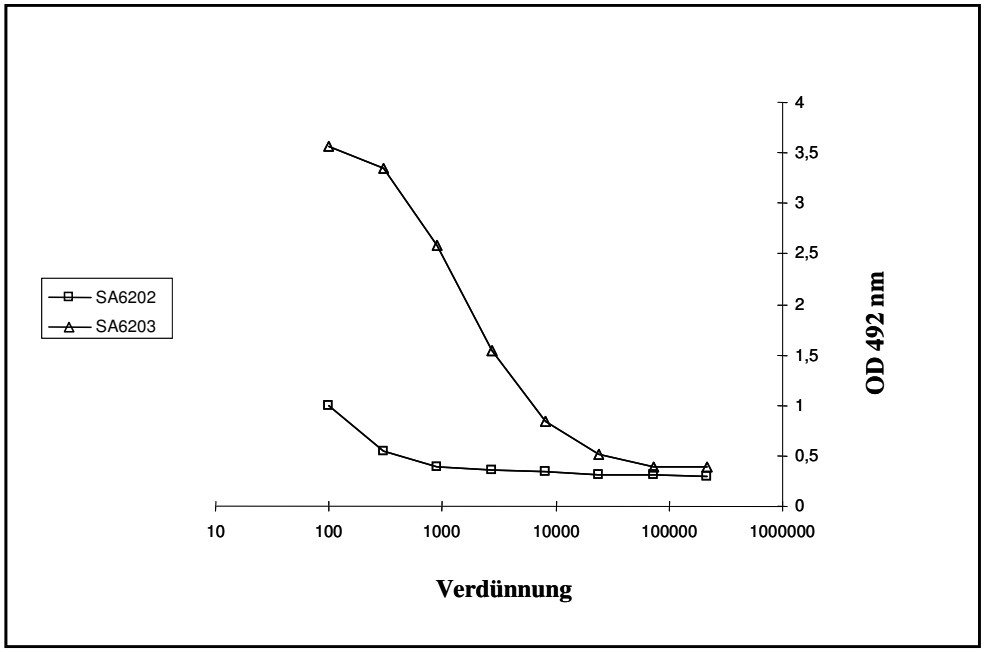


Abb. 3.10: ELISA-Test zur Quantifizierung der vorhandenen Antikörper gegen Efg1 im Serum der finalen Blutung. Die Seren der Kaninchen SA6202 und SA6203 wurden in Doppelbestimmungen getestet. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-RABBIT-IgG-HRP-Konjugat (Sigma) verwendet. Als Substrat für die Nachweisreaktion diente OPD (ortho-Phenylendiamin) und die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm.

3.2.3 Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums

Bei dem produzierten Anti-Efg1-Antiserum handelt es sich um ein polyklonales Antiserum, d. h. um eine Mischung aus Antikörpern, die sich im erkannten Epitop unterscheiden können, die bei der Immunantwort gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gebildet werden. Daher sollte die Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums untersucht werden. Zunächst wurde die Möglichkeit, mit dem Anti-Efg1-Antiserum, Efg1 aus unterschiedlichen Produzentenorganismen nachweisen zu können, untersucht. Hierzu wurden 250 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1 und je 40 µg Rohextrakt verschiedener *S. cerevisiae* und *C. albicans*-Stämme durch SDS-PAGE in einem 4-20 % SDS-Gel aufgetrennt und anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Für die Detektion von Efg1 wurde als Primärantikörper das generierte Anti-Efg1-Antiserum in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein anti-RABBIT-IgG-HRP-Konjugat (1:10000) der Firma Jackson Immunologie Research Lab. Inc.. Die *C. albicans*-Rohextrakte von HLC67 (*efg1*), CAI4 (*EFG1*), H/1.22 (*efg1/efh1*), HLC67 transformiert mit dem Expressionsplasmid pBI-1-His-Efg1 (HLC67[pBI-1-His-Efg1], His-Efg1) (siehe 3.1.3), HLC67 transformiert mit dem Leerplasmid pBI (HLC67[pBI]), HLCEEFG1 (HA-Efg1) (siehe 3.5.2), sowie die *S. cerevisiae* Rohextrakte von RC1695 transformiert mit dem Expressionsplasmid p426-Gal1-His-Efg1 (RC1695[p426-Gal1-His-Efg1], His-Efg1) und RC1695 transformiert mit dem Leerplasmid

p426-Gal1 (RC1695[p426-Gal1]) wurden analysiert (siehe 3.1.2). Abb. 3.11 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Der rote Pfeil markiert die Position der Efg1-Laufhöhe bei ca. 83 kDa. Es ist zu erkennen, dass das generierte Antiserum für die Detektion von Efg1

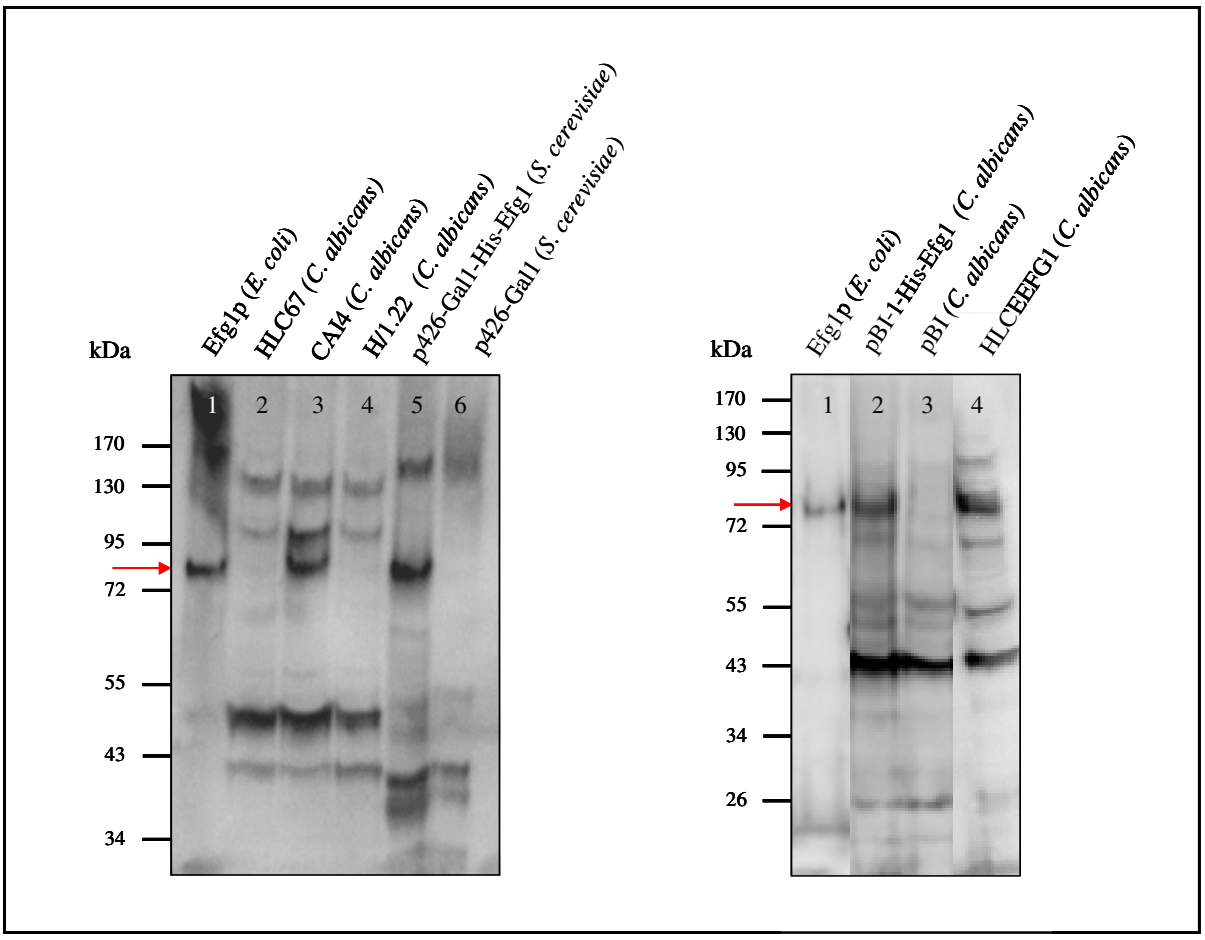


Abb. 3.11: Western-Blot-Analyse (4-20 % SDS-Gel) zum Nachweis der Spezifität des generierten Anti-Efg1-Antiserums. Es wurden 250 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1 bzw. 40 µg Rohextrakt eingesetzt Es wurden die *C. albicans*-Rohextrakte von HLC67 (*efg1*), CAI4 (*EFG1*), H/1.22 (*efg1/efh1*), HLC67 transformiert mit pBI-1-His-Efg1 (Stamm HLC67[pBI-1-His-Efg1]), HLC67 transformiert mit dem Leerplasmid pBI (HLC67[pBI]), HLCEEFG1 (HA-Efg1), sowie die *S. cerevisiae* Rohextrakte von RC1695 transformiert mit p426-Gal1-His-Efg1 (RC1695[p426-Gal1-His-Efg1])) und RC1695 transformiert mit dem Leerplasmid p426-Gal1 (RC1695[p426-Gal1]) eingesetzt. Als Primärantikörper diente das Anti-Efg1-Antiserum (1:5000) und als Sekundärantikörper ein anti-RABBIT-IgG-HRP-Konjugat (1:10000). Es wurde der PageRuler prestained (Fermentas) als Größenstandard verwendet.

aus *E. coli* (A: Spur 1, B: Spur1), *S. cerevisiae* (A: Spur 5) und *C. albicans* (A: Spur 3, B: Spur 2 und 4) geeignet ist. Zudem können auch das wildtypische, unmarkierte Efg1 (A: Spur 3) und auch unterschiedlich epitopmarkierte Efg1-Versionen mit Hilfe des Antiserums nachgewiesen werden (B: Spur 2 (His-Efg1), B: Spur 4 (HA-Efg1)). Neben der spezifischen Efg1-Bande sind bei den verwendeten *S. cerevisiae* und *C. albicans*-Rohextrakten noch weitere unspezifische Banden zu erkennen. Für *C. albicans* wurde vermutet, dass es sich eventuell um Kreuzreaktionen mit dem Efg1-Homolog Efh1 handeln könnte. Daher wurde das Rohextrakt einer *efg1/efh1*-Doppelmutante (A: Spur 4) ebenfalls einer Western-Blot-

Analyse unterzogen. Wie zu erkennen ist, traten jedoch auch hier die gleichen Nebenbanden wie bei der *efg1/efg1*-Einzelmutante auf; daher sind die Hintergrundbanden auf Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers zurückzuführen. Des Weiteren sollte die Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums durch Nachweis von Efg1-Deletionsvarianten überprüft werden. Abb. 3.12 A zeigt ein Schema der von Noffz konstruierten Efg1-Deletionsvarianten (Noffz *et al.*, 2008). Die Deletionen wurden basierend auf dem Plasmid pBI-HAHYD durchgeführt, welches eine HA-markierte Efg1-Version unter Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors beinhaltet. Sämtliche Deletionsvarianten waren über homologe Rekombination in den *LEU2*-

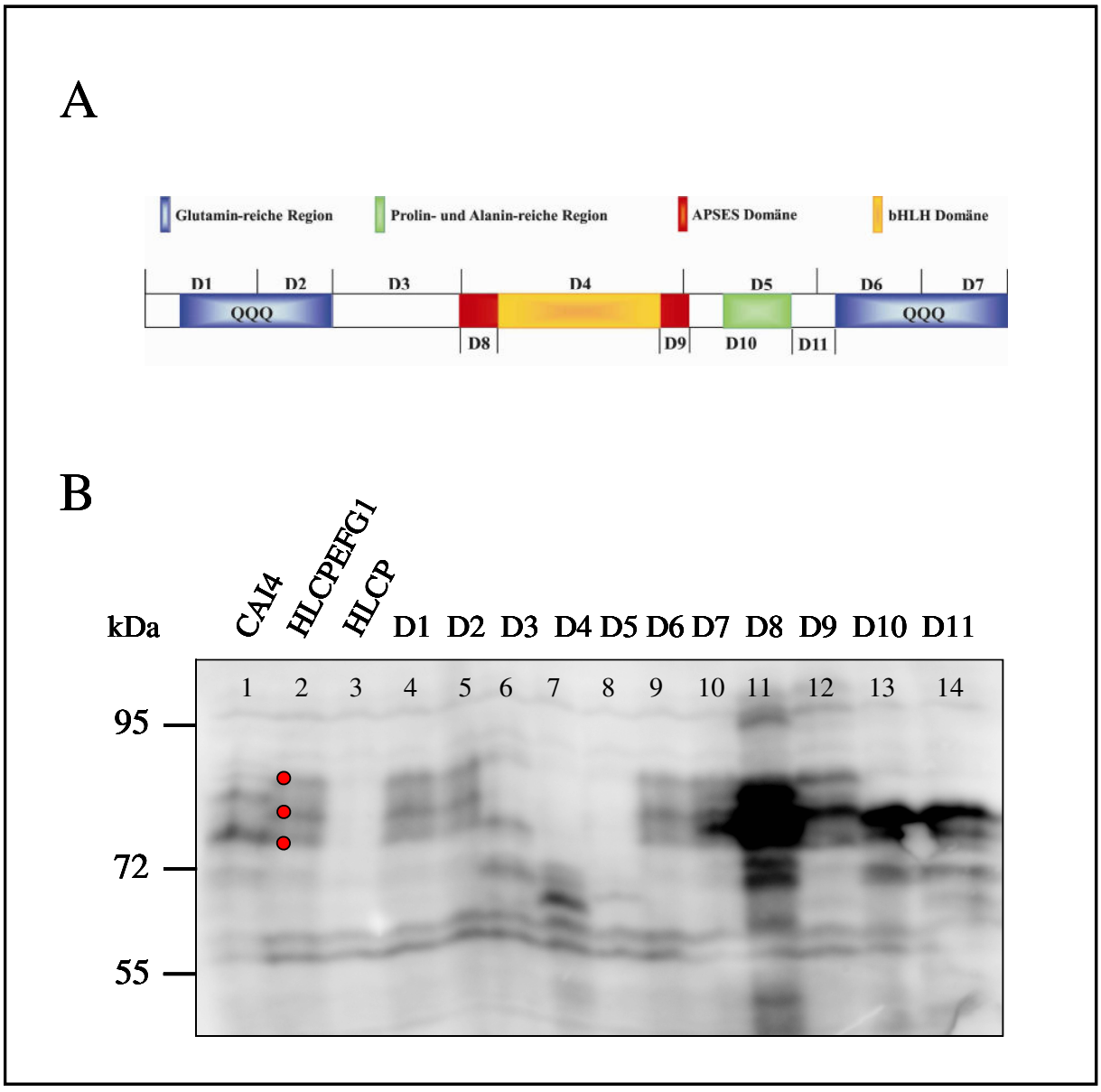


Abb. 3.12: Analyse von Efg1-Deletionsvarianten. A: Deletionsschema der von Noffz (2006) durchgeführten Efg1-Deletionsvarianten. B: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Spezifität des generierten Anti-Efg1-Antiserums. Es wurden 16 cm lange, 8 % SDS-Gele verwendet, um eine bessere Auftrennung zu erhalten. Je 50 µg Rohextrakt der *C. albicans*-Stämme CAI4 (*EFG1*), HLCP (*efg1*), HLCPEFG1 (HA-Efg1) und HLCPEFG1-D1 (HA-Efg1-D1) bis HLCPEFG1-D11 (HA-Efg1-D11) wurden eingesetzt. Zur Orientierung sind durch rote Punkte die drei Efg1-Banden in dem Ausgangsstamm HLCPEFG1 verdeutlicht. Es wurde der PageRuler prestained (Fermentas) als Größenstandard verwendet.

Genort der *efg1*-Mutante (HLC67) integriert worden und dadurch die Stämme HLCPEFG1-D1 bis HLCPEFG1-D11, die Negativkontrolle HLCP (*efg1*) und die Positivkontrolle HLCPEFG1 (HA-Efg1) generiert. Für die Western-Blot-Analyse (Abb. 3.12 B) wurden zur Herstellung von Rohextrakten diese Stämme zur Induktion des *PCK1*-Promotors in SCAA-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 angezogen. Die zusätzliche Positivkontrolle CAI4 (*EFG1*) wurde in YPD-Medium wachsen gelassen. Es wurden ca. 50 µg der hergestellten Rohextrakte auf einem 16 cm langen, 8 % SDS-Gel aufgetrennt und die Detektion von Efg1 in der Western-Blot-Analyse wie in 3.2.3 durchgeführt. Durch Verwendung längerer SDS-Gele konnte eine bessere Auftrennung erreicht werden, da bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass Efg1 als Dreifach-Bande bei einer Größe von 86-90 kDa detektiert werden kann (Bockmühl und Ernst, 2001). Dieses ungewöhnliche Laufverhalten ist vermutlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Auf Laufhöhe der posttranslationalen Modifikationen der einzelnen Deletionsvarianten wird in Abschnitt 3.4.3 eingegangen. Für die Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums ist ausschlaggebend, dass sämtliche Efg1-Deletionsvarianten mit dem Anti-Efg1-Antiserum nachgewiesen werden konnten, obwohl Deletion 5 (B: Spur 8) nur sehr schwach und Deletion 8 (B: Spur 11) sehr stark detektiert werden kann. Der Vergleich mit der Negativkontrolle HLCP (B: Spur 3) erlaubt dabei die Differenzierung der Hintergrundbanden von den spezifischen Efg1-Banden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das generierte Anti-Efg1-Antiserum Immunglobuline enthält, die sämtliche Epitope des Efg1-Antigens erkennen.

3.2.4 Immunpräzipitation

Neben der Detektion von Efg1 in Western-Blot-Analysen fand das hergestellte Anti-Efg1-Antiserum auch Anwendung in der Immunpräzipitation von Efg1. Hierbei wurde wie in 2.6.11 beschrieben vorgegangen. Für die Analyse wurden Rohextrakte des Wildtyp-Stammes CAI4 (*EFG1*) und einer *efg1*-Mutante HLC67 (*efg1*) verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 25 µl des Anti-Efg1-Antiserums an 50 µl der Dynabeads Protein G gekoppelt. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation von Efg1 aus 150 µl Rohextrakt (ca. 900 µg Protein). Die Analyse des Präzipitats wurde durch Western-Blot-Analyse vorgenommen. In Abb. 3.13 ist auf Efg1-Laufhöhe von ca. 83 kDa (roter Pfeil) in der Spur des Wildtyp-Stammes CAI4 eine deutliche Bande zu erkennen, welche in der Kontrolle der *efg*-Mutante HLC67 nicht zu erkennen ist. Somit war es möglich, mit dem Anti-Efg1-Antiserum das wildtypische Efg1 zu präzipitieren. Außerdem konnte das Anti-Efg1-Antiserum auch erfolgreich für die Immunpräzipitation im Rahmen von Chromatinimmunpräzipitations-Experimenten (ChIP) eingesetzt werden (Lassak, pers. Mitteilung).

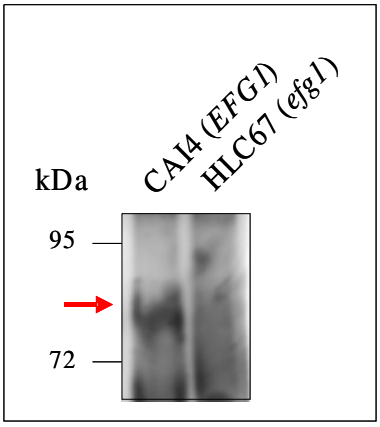


Abb. 3.13: Western-Blot-Analyse (8 % SDS-Gel) des Präzipitats einer Immunpräzipitation. Es wurden pro Reaktionsansatz 50 µl der Dynabeads Protein G (Invitrogen), 25 µl des Anti-Efg1-Antiserum und je 150 µl Rohextrakt (ca. 900 µg Protein) der Stämme CAI4 (*EFG1*) und HLC67 (*efg1*) eingesetzt. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.3 Gelfiltrationschromatographie zur Analyse der molekularen Masse von Efg1

Bei der Gelfiltrationschromatographie handelt es sich um eine Ausschlusschromatographie. Das Reinigungsprinzip beruht auf einer Auftrennung von Molekülen nach ihrer molekularen Größe. Das verwendete Gelfiltrationsmaterial fungiert dabei als ein molekulares Sieb, so dass große Moleküle bereits im Ausschlussvolumen der Säule eluieren, kleinere Moleküle hingegen dringen in die Poren des Gelfiltrationmaterials ein und eluieren ihrer Größe entsprechend erst später von der Säule. Dabei sollte die verwendete Säulenmatrix aus hydrophilen, ungeladenen Partikeln gleicher Größe bestehen, wobei die Porengröße den Bereich der optimalen Auftrennung bestimmt. Durch Verwendung der Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) war eine Auftrennung in einem Größenbereich von 10–600 kDa möglich. Das entsprechende Bettvolumen der Säule betrug 24 ml. Um ein Verstopfen der Säulenmatrix mit Luftbläschen zu verhindern, mussten sämtliche Proben und der Laufpuffer entgast und steril filtriert werden. Für die Gelfiltrationschromatographie wurde die Säule an den ÄKTAprime plus (GE Healthcare) angeschlossen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min eluiert. Proteine die von der Säule eluierten, wurden durch UV-Absorption bei 280 nm detektiert. Mit einem Fraktionssammler wurden Aliquots von 200 µl gesammelt, welche anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse untersucht wurden.

3.3.1 Eichung der Gelfiltrationssäule

Zur Ermittlung der relativen Molekülmasse eines unbekannten Proteins musste zunächst eine Kalibriergerade mit Proteinen bekannter Molekülmasse angefertigt werden. Hierfür wurden Markerproteine von der Firma Sigma (Gel Filtration Molecular Weight Markers) benutzt, die durch ihre Molekulargewichte einen Messbereich von 29-669 abdecken. Im Einzelnen handelte es sich um die Carbonatanhydrase aus Rinder-Erythrocyten (3 mg/ml; Molekulargewicht 29), Rinderserum-Albumin (10 mg/ml; Molekulargewicht 66), Alkoholdehydrogenase (5 mg/ml; Molekulargewicht 150), β-Amylase (4 mg/ml; Molekulargewicht 200), Apoferritin (10 mg/ml; Molekulargewicht 434) und Thyroglobulin (8 mg/ml; Molekulargewicht 669). Für die Normierung wurde zusätzlich zur Ermittlung des Ausschlussvolumens (void) der Säule Blue Dextran (2 mg/ml; Molekulargewicht 2000) verwendet. Auf Grund seiner Größe interagiert dieses nicht mit der Säulenmatrix und eluiert daher mit dem Ausschlussvolumen der Säule. Sämtliche Markerproteine wurden in der angegebenen Konzentration in Laufpuffer gelöst und in einem Volumen von 500 µl auf die Säule gegeben. Abb. 3.14 zeigt das Profil der Gelfiltrationschromatographie von Blue Dextran zur Ermittlung des Ausschlussvolumens.

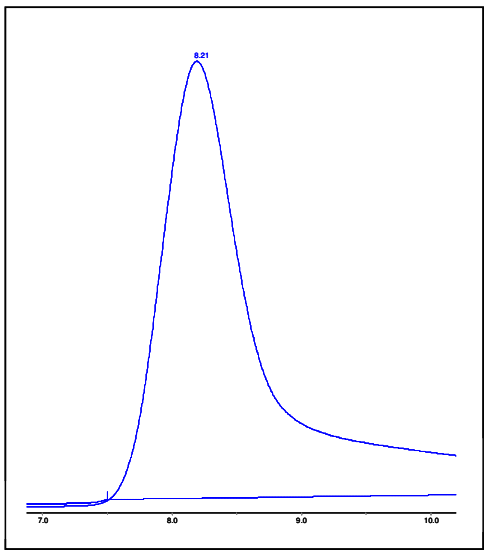


Abb. 3.14: Profil der Gelfiltrationschromatographie von Blue Dextran (2 mg/ml in Laufpuffer) zur Ermittlung des Ausschlussvolumens (8,21 ml). Die Probe wurde in einem Volumen von 500 µl eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe bei 280 nm.

Das Ausschlussvolumen (void) der Säulenmatrix mit dem verwendeten Laufpuffer beträgt 8,21 ml. Somit eluieren Proteine, die eine molekulare Masse von über 2000 kDa haben in diesem Ausschlussvolumen. In einem nächsten Durchlauf wurde ein Gemisch bestehend aus den übrigen Markerproteinen aufgetrennt. In Abbildung 3.15 ist das chromatographische Profil der verwendeten Standardproteine gezeigt.

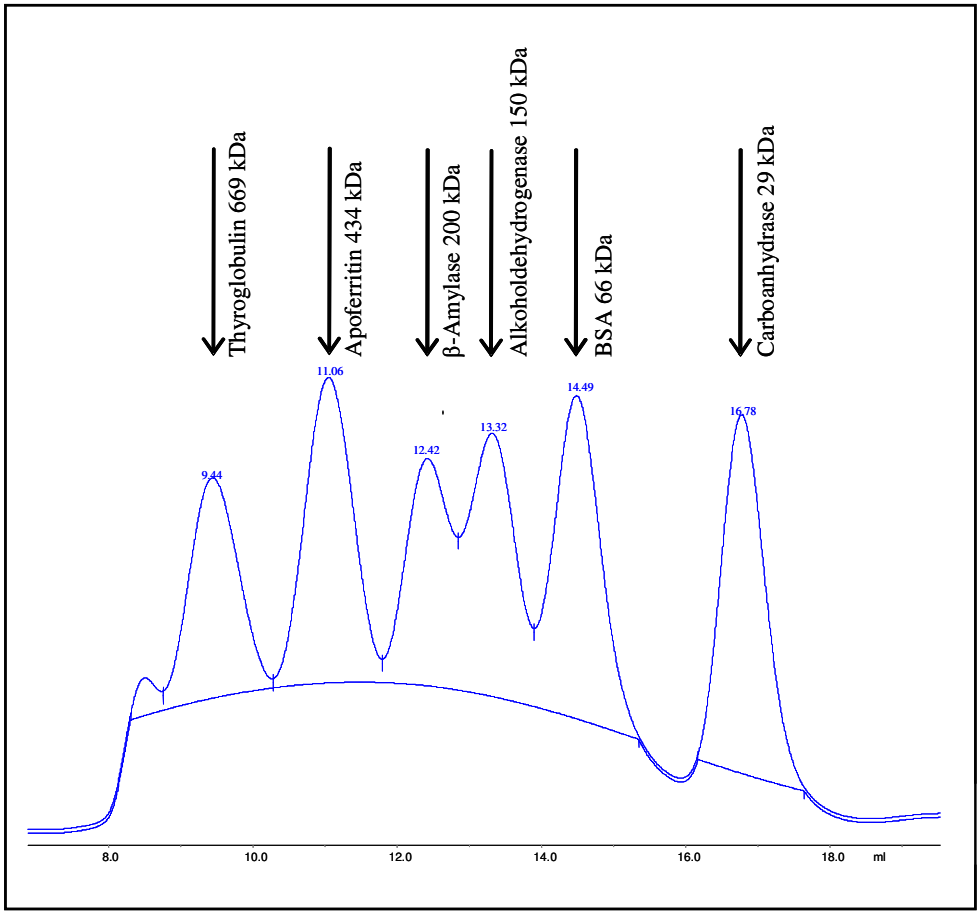


Abb. 3.15: Profil der Gelfiltrationschromatographie von Markerproteinen (Gel Filtration Molecular Weight Markers, Sigma). Die Markerproteine wurden in folgender Konzentration mit Laufpuffer angesetzt: Thyroglobulin (8 mg/ml), Apoferritin (10 mg/ml), β-Amylase (4 mg/ml), Alkoholdehydrogenase (5 mg/ml), BSA (10 mg/ml), Carbonatanhydrase (3 mg/ml). Die Proben wurden jeweils in einem Volumen von 500 µl eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe bei 280 nm.

In der Tabelle von Abb. 3.16 A sind zusammenfassend die Ergebnisse der Standardproteine mit den jeweils ermittelten spezifischen Durchflussvolumina angegeben. Basierend auf diesen Werten war es nun möglich eine entsprechende Eichgerade zu erstellen, anhand derer die molekulare Masse der zu untersuchenden Proteine ermittelt werden konnte. Hierzu wurde in einem Diagramm der Koeffizient (Durchflussvolumen Ve/Ausschlussvolumen void) der einzelnen Komponenten gegen ihre molekulare Masse aufgetragen. Die molekulare Masse Y eine Proteins lässt sich nun mit Hilfe der resultierenden Geradengleichung berechnen ($y = 50590e^{-3,6562x}$). Dabei ergibt sich X aus dem Durchflussvolumen der zu untersuchenden Fraktion/das Ausschlussvolumen der Säule.

A

Standard	molekulare Masse (kDa)	Durchflussvolumen Ve (ml)	DurchflussvolumenVe / Ausschlussvolumen Void (8,21 ml)
Thyroglobulin	669	9,44	1,15
Apoferritin	434	11,06	1,35
β-Amylase	200	12,42	1,51
Alkoholdehydrogenase	150	13,32	1,62
BSA	66	14,49	1,76
Carbonatanhydrase	29	16,84	2,05
Blue Dextran	2000	8,21	1

B

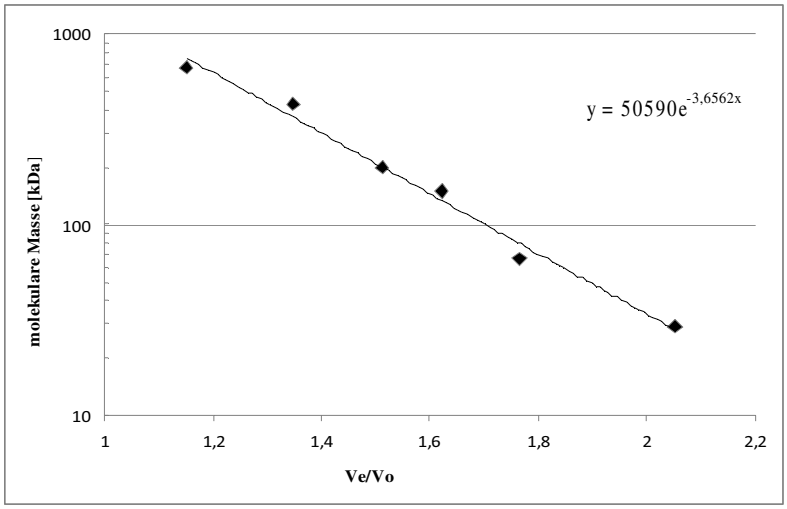


Abb. 3.16. Gelfiltrationschromatographie-Eichgerade. A: Tabelle mit den ermittelten Messwerten der verwendeten Standardproteine zur Ermittlung einer Eichgeraden. B: Eichgerade der verwendeten Standardproteine. Es wurde Durchflussvolumen Ve/ Ausschlussvolumen void gegen die molekulare Masse aufgetragen. Es ergibt sich die Geradengleichung $y = 50590e^{-3,6562x}$.

3.3.2 Gelfiltrationschromatographie zur Ermittlung der molekularen Masse von Efg1

Um die molekulare Masse von Efg1 zu ermitteln, wurde Efg1 zunächst über Metallaffinitätschromatographie aus *E. coli* gereinigt. Nach SDS-PAGE zur Identifizierung von Efg1 wurden anschließend ca. 50 µg Efg1 steril filtriert und in einem Volumen von 500 µl für die Gelfiltrationschromatographie mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min eingesetzt. Über den gesamten Messverlauf wurden insgesamt 60 Fraktionen mit je 200 µl Volumen gesammelt, die dabei einen Bereich von 6,5–18,5 ml Durchflussvolumen abdeckten. Anschließend wurden 9 µl der Gelfiltrations-Fraktionen 8-48 für eine Western-Blot-Analyse verwendet. In Abb. 3.17 A ist das Profil der Gelfiltrationschromatographie von Efg1 aus *E.*

coli gezeigt. Nach 8,24 ml Durchflussvolumen ist ein deutlicher Peak zu erkennen. Dieser Peak spiegelt das Ausschlussvolumen wieder, das Proteine einer molekularen Masse von über

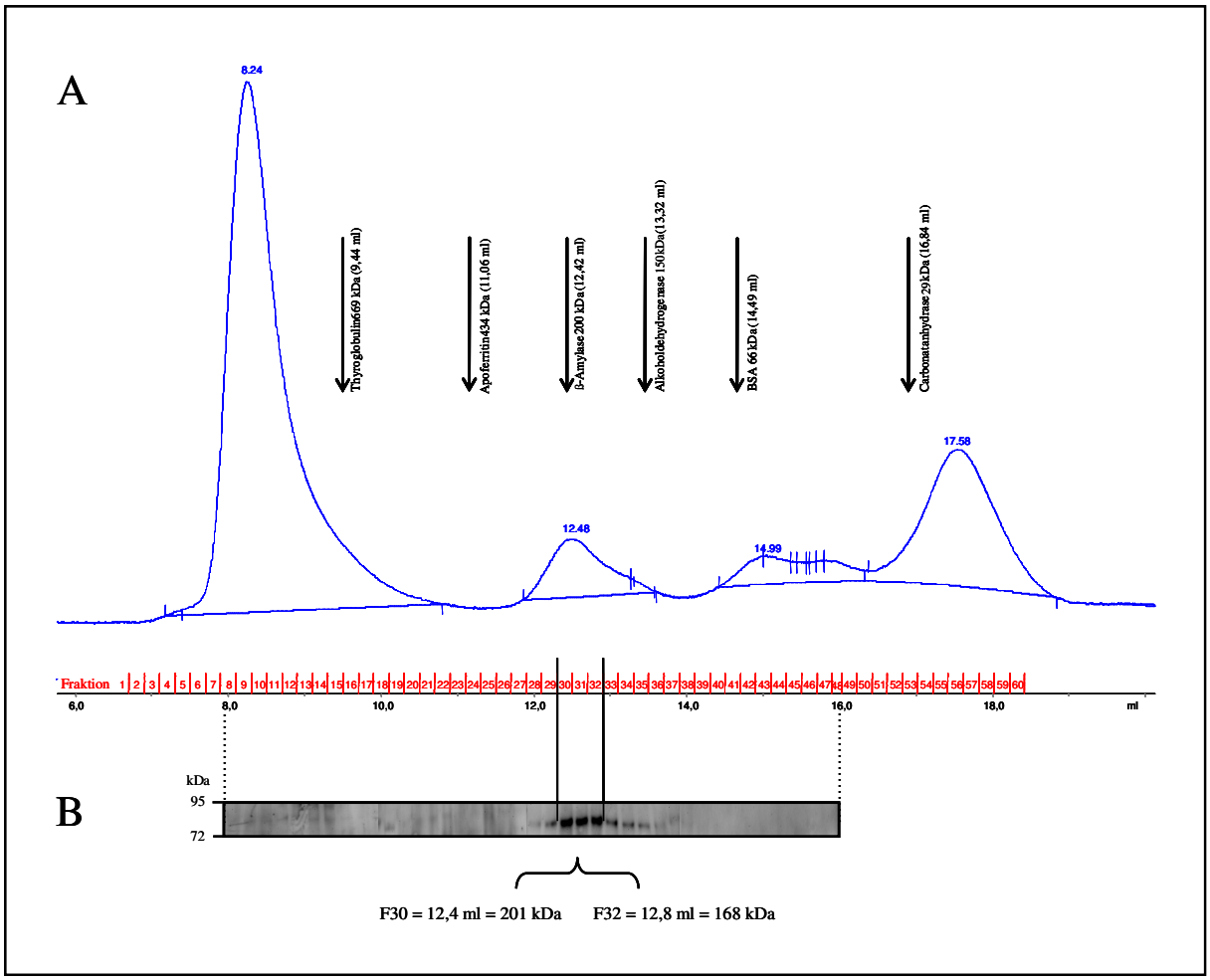


Abb. 3.17. Gelfiltrationschromatographie von Efg1. A: Profil der Gelfiltrationschromatographie von gereinigtem Efg1 (ca. 50 µg) aus *E. coli*. Während der Chromatographie wurden 60 Fraktionen mit je 200 µl Volumen gesammelt. Die Probe wurde in einem Volumen von 500 µl eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe bei 280 nm. B: Die Western-Blot-Analyse der Elutionsfraktionen 8-48 wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

2000 kDa enthält. Efg1 war teilweise aggregiert und eluierte daher im Ausschlussvolumen. Außerdem zeigte das Diagramm drei weitere Peaks auf, wobei in den zwei letzteren Peaks des Diagramms vermutlich Verunreinigungen und kleinere Bestandteile des Laufpuffers aber nicht Efg1 eluieren. In Abb. 3.17 B ist eine Western-Blot-Analyse der Elutionsfraktionen 8-48 gezeigt, die Efg1 hauptsächlich in den Fraktionen 29-35 zu erkennen gibt, welche mit dem zweiten Peak (Durchflussvolumen von 12,48 ml) übereinstimmen. Das stärkste Efg1-Signal ist dabei bei den Fraktionen 30-32 zu beobachten. Setzt man das Durchflussvolumen der Fraktionsgrenzen (F30 = 12,4 ml, F32 = 12,8 ml) in die in Abb. 3.16 B ermittelte Geradengleichung ein, so ergibt sich eine molekulare Masse für Efg1 von 168 bis 201 kDa. Da Efg1 durch SDS-PAGE bei einer Laufhöhe von ca. 83 kDa nachgewiesen werden kann, spricht das erhaltene Ergebnis dafür, dass Efg1 in der Zelle als Dimer und nicht als Monomer

vorkommt. Andererseits ist die berechnete molekulare Masse von Efg1 61 kDa, so dass es sich auch um ein Efg1-Trimer oder um multimere Efg1-Komplexe handeln könnte. Da von bHLH-Proteinen bekannt ist, dass sie meist als Dimere agieren, ist jedoch ein Efg1-Dimer am wahrscheinlichsten. Zur Überprüfung, ob dieses Ergebnis auch für Efg1 aus *C. albicans* zutrifft, wurde in identischer Weise eine Gelfiltrationschromatographie mit gereinigtem Efg1 aus *C. albicans* vorgenommen. Auch hier wurde ein deutliches Efg1-Signal in den Fraktionen mit den Fraktionsgrenzen 12,4 bis 12,8 ml festgestellt (Daten nicht gezeigt). Somit konnte bewiesen werden, dass Efg1 in *E. coli* und auch in *C. albicans* vermutlich nicht als Monomer, sondern als Dimer vorliegt.

3.3.3 Vernetzung von Efg1 durch einen „Crosslinker“

Um zu bestätigen, dass Efg1 in der Zelle nicht als Monomer, sondern vermutlich als Dimer vorliegt, sollte dieses Verhalten durch Vernetzung mit einem Crosslinker bestätigt werden (2.6.10). Bei dem verwendeten Crosslinker BS^3 (Bis [sulfosuccinimidyl] suberat) handelt es sich um einen wasserlöslichen, nicht spaltbaren, Membran-impermeablen Crosslinker. NHS (N-hydroxysulfosuccinimide)-Ester des Crosslinkers reagieren bei einem pH-Wert von 7-9 mit primären Aminen unter Ausbildung von stabilen Amid-Brücken. Proteine besitzen primäre Amine entweder in Seitengruppen von Lysinen oder am N-Terminus des Polypeptids. Für die Reaktion wurden ca. 500 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1 eingesetzt. Als Reaktionspuffer wurde ein 10 mM HEPES-Puffer, pH 9 verwendet. Der BS^3-Crosslinker wurde in den Konzentrationen 0, 0,3, 0,7, 1 und 2 mM eingesetzt. In Abb. 3.18 ist das Ergebnis der Western-Blot-Analyse dargestellt. Durch rote Pfeile sind vorhandene Banden und ihre jeweilige Laufhöhe verdeutlicht. Ohne Zugabe des Crosslinkers ist eine deutliche Efg1-Bande bei einer Laufhöhe von ca. 83 kDa auszumachen. Des Weiteren sind unterhalb dieser Efg1-Bande weitere Banden bei Laufhöhen von ca. 60, 55, 45 und 40 kDa zu erkennen. Vermutlich handelt es sich bei diesen Banden um proteolytische Abbauprodukte von Efg1. Mit zunehmender Konzentration des zugefügten Crosslinkers kann stufenartig ein Auftreten von Banden bei Laufhöhen von ca. 100 bis ca. 170 kDa beobachtet werden, wobei das Signal am stärksten bei einer Crosslinker-Konzentration von 2 mM bei der Laufhöhe von ca. 170 kDa ist. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Bande von Efg1 und den sich darunter befindlichen Banden. Wahrscheinlich handelt es sich bei der höchsten verwendeten Crosslinker-Konzentration von 2 mM um das vernetzte Efg1-Dimer bei der entsprechenden Laufhöhe von ca. 170 kDa. Bei den geringeren Konzentrationen sind vermutlich Vernetzungsprodukte mit seinen unterschiedlich großen, proteolytischen Abbauprodukten zu erkennen.

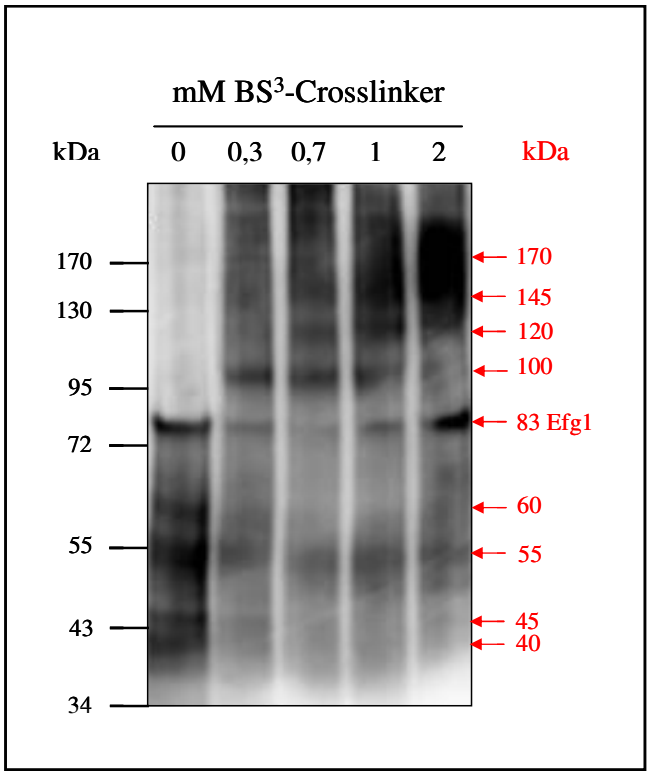


Abb. 3.18. Western-Blot-Analyse (8 % SDS-Gel) der Vernetzung von Efg1 mit BS^3-Crosslinker. Es wurden 500 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1 eingesetzt. Die Reaktion fand in einem Endvolumen von 30 µl mit 10 mM HEPES-Puffer, pH 9 statt. Der Crosslinker wurde in den Konzentrationen 0, 0,3, 0,7, 1 und 2 mM eingesetzt. Rote Pfeile deuten auf vorhandene Banden mit ihrer jeweiligen Laufhöhe. Die Reaktion wurde durch 1,5 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5 abgestoppt.

3.4 Posttranslationale Modifikation von Efg1

Die berechnete molekulare Masse von Efg1 beträgt ca. 62 kDa. Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließende Immunoblot-Analyse ergibt jedoch eine Dreifachbande bei einer Laufhöhe von ca. 75-88 kDa (Bockmühl und Ernst, 2001). Diese Auftrennung wird allerdings nur durch Verwendung von längeren SDS-PAGE-Apparaturen erreicht. Dass es sich bei den oberen beiden Banden um posttranslationale Modifikationen, durch Phosphorylierungen handelt, wurde bereits durch eine Dephosphorylierung mit einer Phosphatase nachgewiesen (Bockmühl, 2001). Die drei detektierbaren Efg1-Banden erstrecken sich insgesamt über einen Bereich von ca. 13 kDa. Dieser Bereich erscheint zu groß, um das Resultat von zwei einzelnen Phosphatgruppen zu sein und deswegen muss höchstwahrscheinlich von Mehrfachphosphorylierungen ausgegangen werden. Der Grund für das unterschiedliche Laufverhalten des unphosphorylierten Efg1 zu seiner berechneten molekularen Masse konnte bisher ebenfalls nicht geklärt werden.

3.4.1 Phosphorylierung von Efg1

Für die Analyse des ungewöhnlichen Laufverhaltens von Efg1, wurde Efg1 aus *E. coli*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* durch SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Es wurden 200 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1, 50 µg Rohextrakt des *C. albicans*-Wildtypstammes CAI4 und 50 µg Rohextrakt des *S. cerevisiae*-Stammes RC1695[p426-Gal1-His-Efg1] verwendet. Parallel wurde eine Efg1-Probe aus jedem Organismus mit Lambda-Proteinphosphatase dephosphoryliert. In Abb. 3.19 ist jeweils die unbehandelte Efg1-Probe, neben der Phosphatase-behandelten Efg1-Probe aus den drei untersuchten Organismen aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die dephosphorylierten Efg1-Proben aus *S. cerevisiae* und *C. albicans*

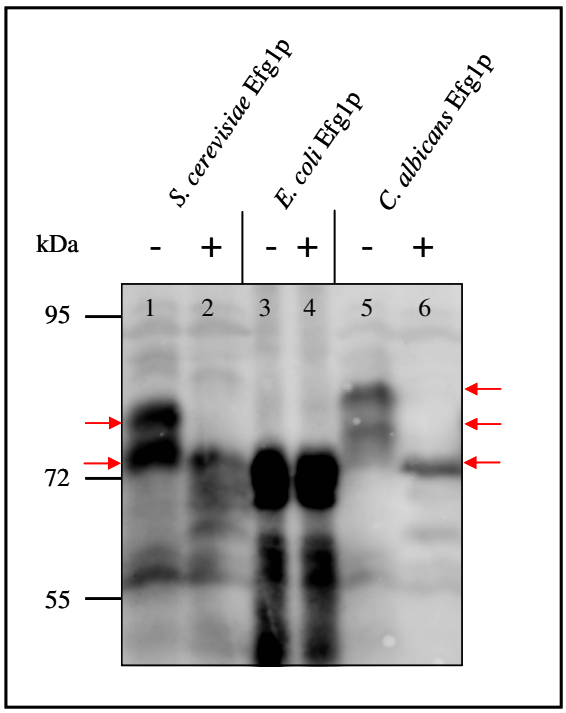


Abb. 3.19: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der posttranslationalen Modifikation von Efg1. Die Anzucht der Stämme erfolgte in YPD-Medium (CAI4) oder in YNB-Medium mit 2 % Galaktose und 0,1 % Glukose (RC1695[p426-Gal1-His-Efg1]) bis zu einer OD_{600} = 0,8. 200 ng aus *E. coli* gereinigtes Efg1 und je 50 µg Rohextrakt des *C. albicans*-Stammes CAI4 (*EFG1*) und des *S. cerevisiae* Stammes RC1695[p426-Gal1-His-Efg1] wurden entweder unbehandelt verwendet (Spur: -) oder mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (Spur: +) versetzt und für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

ein verändertes Laufverhalten im Vergleich zu den unbehandelten Proben zeigen. Bei *C. albicans* sind drei und bei *S. cerevisiae* zwei Efg1-Banden nachzuweisen, wobei bei der *S. cerevisiae*-Probe die dritte Efg1-Bande eventuell nicht detektiert werden kann. Durch Behandlung mit Lambda-Proteinphosphatase werden die oberen Banden entfernt und es ist nur noch eine einzige Bande auf Laufhöhe der untersten der drei Banden zu erkennen. Bei *E. coli* hingegen kann kein Unterschied im Laufverhalten nach Phosphatasebehandlung festgestellt werden. Die einzige Efg1-Bande, die sowohl in unbehandelter, als auch in der

Phosphatase-behandelten Probe auftritt, befindet sich auf Laufhöhe der unphosphorylierten Efg1-Banden von *S. cerevisiae* und *C. albicans*. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den höhermolekularen Efg1-Spezies um Eukaryonten-spezifische posttranslationale Phosphorylierungen handelt.

3.4.2 Posttranslationale Modifikation von Efg1 nach Hypheninduktion

Efg1 wird als globaler Regulator von *C. albicans*, unter anderem zur Induktion der Hyphenbildung benötigt (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997), wobei die Aktivierung von Efg1 vermutlich durch eine Phosphorylierung vorgenommen wird (Bockmühl, 2001). Durch Northernanalysen konnte gezeigt werden, dass direkt nach Hypheninduktion die Expression von *EFG1* durch negative Autoregulation reduziert wird. Unterbleibt dieser negative Feedback-Loop, kommt es nicht zur Ausbildung von echten Hyphen, sondern zum pseudohyphalen Wachstum (Tebarth *et al.*, 2003). Welcher Effekt auf Proteinebene nach Hypheninduktion eintritt, konnte bisher nicht geklärt werden. Daher sollte das Laufverhalten von Efg1 bzw. sein Phosphorylierungsmuster nach Hypheninduktion untersucht werden. Hierzu wurde der *C. albicans*-Stamm CAI4 (*EFG1*) in YPD-Medium angezogen. Die Hauptkultur wurde auf eine OD_{600}=0,2 inokuliert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hypheninduktion durch Zugabe von 10 % Pferdeserum und die weitere Inkubation bei 37 °C. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Hypheninduktion (0, 10, 20, 60, 90, 120 min) wurde die Kultur pelletiert und es wurden Proteinrohextrakte hergestellt. Von jedem Zeitpunkt wurden jeweils 50 µg Rohextrakt entweder direkt in SDS-Ladepuffer aufgenommen, oder es erfolgte zuvor noch eine zusätzliche Behandlung mit Lambda-Proteinphosphatase zur Dephosphorylierung der Proteine. Anschließend wurden sämtliche Proben einer Western-Blot-Analyse (Abb. 3.20) unterzogen. Unbehandelte Proben sind durch ein (–) Zeichen und behandelte Proben durch ein (+) Zeichen gekennzeichnet. In Spur 1 sind die 3 Banden des Efg1-Proteins in einer Laufhöhe von 75-88 kDa zu erkennen. Dabei zeigt die mittlere Bande bei einer Laufhöhe von ca. 83 kDa das stärkste Signal. Durch Zugabe der Lambda-Proteinphosphatase ändert sich das Phosphorylierungsmuster dahingehend, dass die beiden oberen Banden verschwinden und nur noch die untere Bande nachweisbar ist. Betrachtet man nun das Phosphorylierungsmuster zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Hypheninduktion, so kann festgestellt werden, dass es über den zeitlichen Verlauf zu einer Abschwächung des Signals der obersten Bande kommt. Gleichzeitig scheint sich die Intensität der mittleren Bande zu verstärken. Bei allen Zeitpunkten ist nach Behandlung mit Lambda-Proteinphosphatase eine Dephosphorylierung des Proteins auf Laufhöhe der untersten Bande zu verzeichnen. Vermutlich ändert sich ca. 20 min nach Hypheninduktion das Phosphorylierungsmuster von Efg1. Eventuell kommt es zu einer partiellen Dephosphorylierung von Efg1, so dass es zu einem Anstieg der phosphorylierten Efg1-Form

auf Höhe der mittleren Bande kommt. Da diese mittlere Efg1-Bande in allen Versuchen die stärkste Intensität aufweist, scheint es sich bei dieser Bande um eine Efg1-Variante mit einer gewissen Grundphosphorylierung zu handeln. Allgemein konnte bei allen durchgeführten Untersuchungen festgestellt werden, dass die obere Bande sehr instabil ist und somit auch nicht immer in Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden kann.

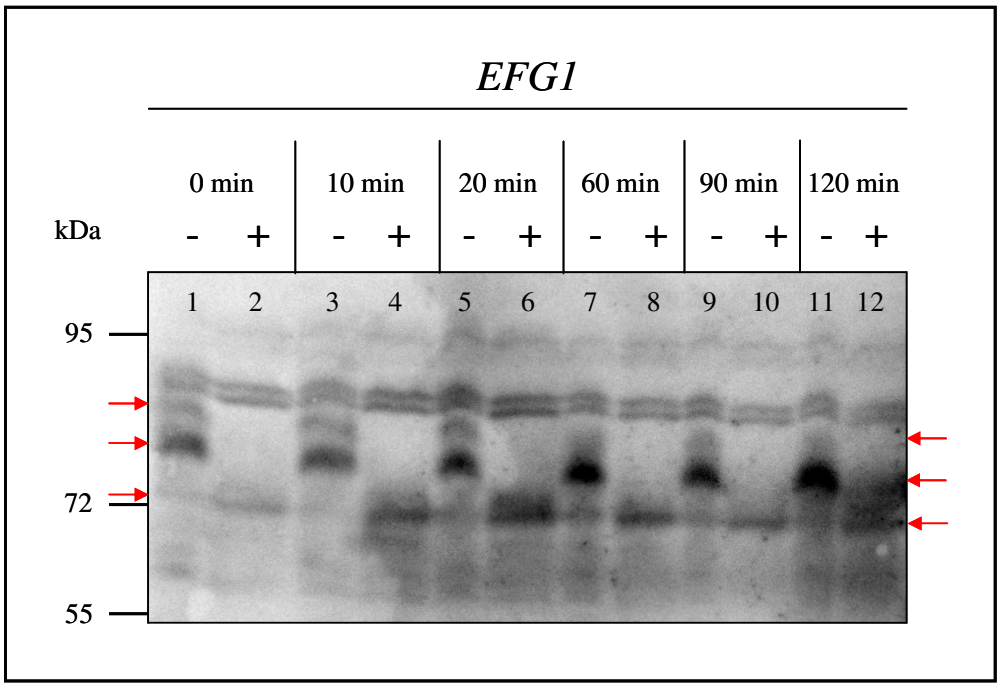


Abb. 3.20: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der posttranslationalen Modifikation von Efg1 nach Hypheninduktion. Die Hypheninduktion erfolgte durch Zugabe von 10 % Pferdeserum zum verwendeten YPD-Medium und Inkubation bei 37 °C. Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Hypheninduktion geerntet und es wurden Proteinrohextrakte isoliert. Von jedem Erntezeitpunkt wurden je 50 µg Rohextrakt des *C. albicans*-Stammes CAI4 (*EFG1*) entweder unbehandelt verwendet (Spur: -) oder mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (Spur: +) versetzt und für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Rote Pfeile verdeutlichen die drei Efg1-Banden. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, wird Efg1 vermutlich über den Phosphorylierungszustand reguliert. In früheren Arbeiten konnte durch den T206 Aminosäureaustausch in der Proteinkinase A-Zielsequenz gezeigt werden, dass Efg1 durch eine PKA-Phosphorylierung aktiviert wird (Bockmühl und Ernst, 2001). Bei *C. albicans* besteht die PKA neben der inhibierenden Untereinheit Bcy1 noch aus den beiden katalytischen Untereinheiten Tpk1 und Tpk2, die eine unterschiedliche Funktion hinsichtlich der Hyphenmorphogenese besitzen. So beeinflusst Tpk1 die Hypheninduktion auf festen und Tpk2 in flüssigen Medien (Cassola *et al.*, 2004). Außerdem konnte eine Beteiligung von Tpk2 an der negativen Autoregulation von Efg1 festgestellt werden (Lassak, per. Mitteilung). Daher wurde das Phosphorylierungsmuster von Efg1 in den *tpk1*- und auch *tpk2*-Deletionsmutanten tpk1mut (*tpk1*) und tpk2mut (*tpk2*) untersucht. Abb. 3.21 zeigt den Phosphorylierungszustand zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Hypheninduktion. Wie im Wildtyp ist Efg1 als Dreifachbande zu detektieren, und eine Behandlung mit Lambda-Proteinphosphatase bewirkt eine Dephosphorylierung des Proteins,

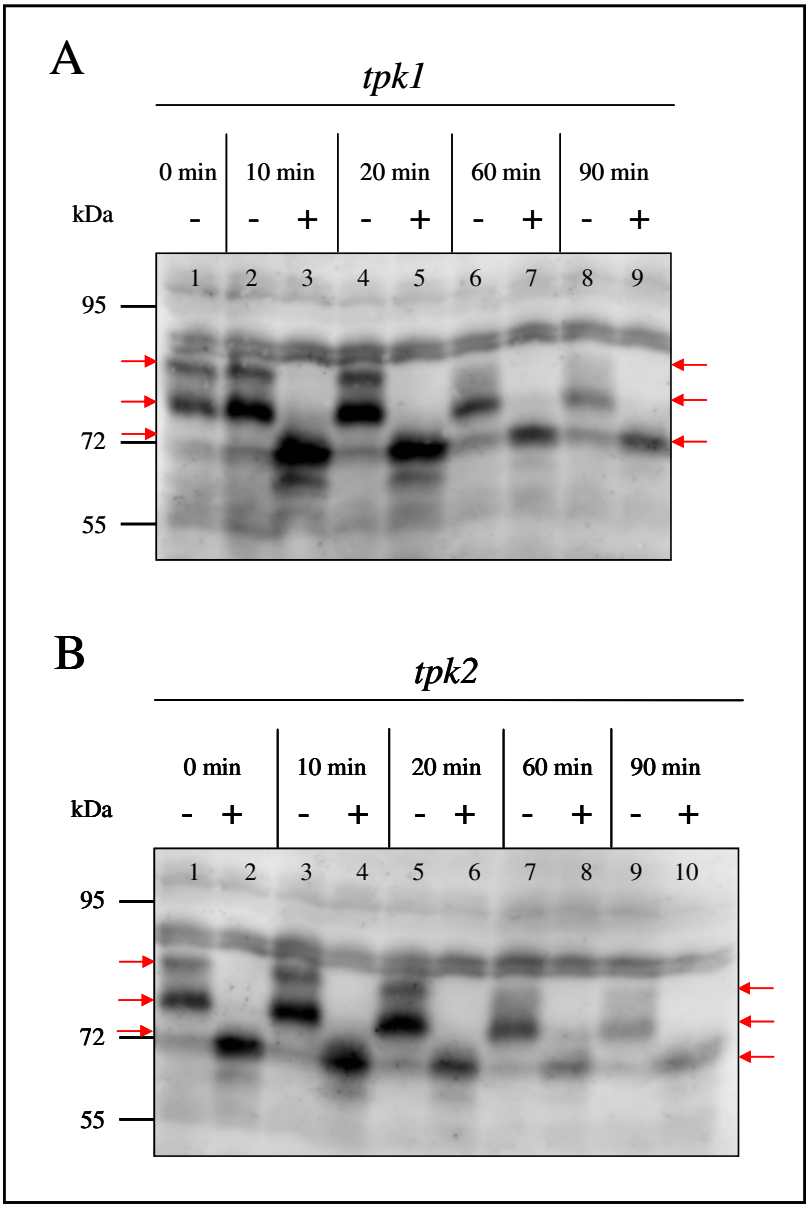


Abb. 3.21: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der posttranslationalen Modifikation von Efg1 nach Hypheninduktion in *tpk1* (A)- bzw. *tpk2* (B)-Deletionsmutanten. Die Hypheninduktion erfolgte durch Zugabe von 10 % Pferdeserum zum YPD-Medium und Inkubation bei 37 °C. Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Hypheninduktion geerntet und es wurden Proteinrohextrakte isoliert. Von jedem Erntezeitpunkt wurden je 50 µg Rohextrakt der *C. albicans*-Stämme tpk1mut (*tpk1*) und tpk2mut (*tpk2*) entweder unbehandelt verwendet (Spur: -) oder mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (Spur: +) versetzt und für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

wobei die mittlere der drei Efg1-Banden wiederum die stärkste Intensität aufweist. In beiden mutanten Stammhintergründen kann über den Verlauf eine Abnahme der Efg1-Proteinmenge festgestellt werden, wobei auch die Abschwächung der obersten Efg1-Bande beobachtet werden konnte. Somit kann kein wesentlicher Unterschied zwischen der *tpk1*- und der *tpk2*-Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Dabei muss aber auch beachtet werden, dass die Funktion der beiden Tpk-Isoformen bei der Efg1 Phosphorylierung redundant sein könnte.

Eine *tpk1*/*tpk2*-Doppelmutante ist nicht lebensfähig, so dass diese Annahme nicht leicht überprüft werden kann.

3.4.3 Posttranslationale Modifikation von Efg1-Deletionsvarianten

Durch Dephophorylierung von Efg1-Deletionsvarianten (Abb. 3.22 A) sollte herausgefunden werden, welche Bereiche von Efg1 für eine posttranslationale Phosphorylierung notwendig sind. Hierzu wurden die von Noffz konstruierten Stämme HLCPEFG1-D1 bis HLCPEFG1-D11, die Negativkontrolle HLCP (*efg1*) und die Positivkontrollen HLCPEFG1 (HA-Efg1) und CAI4 (*EFG1*) verwendet, welche auch schon in 3.2.3 verwendet wurden (Noffz *et al*., 2008). Jeweils 50 µg Rohextrakt wurden entweder direkt in SDS-Ladepuffer aufgenommen oder es erfolgte zuvor noch eine zusätzliche Behandlung mit Lambda-Proteinphosphatase zur Dephosphorylierung der Proteine. Abb. 3.22 B zeigt das Ergebnis der durchgeführten Western-Blot-Analyse. Nicht dephosphorylierte Proben sind durch ein (–) Zeichen und Phosphatase-behandelte Proben durch ein (+) Zeichen gekennzeichnet. Die Negativkontrolle HLCP zeigte wie erwartet keine Efg1-Banden. Bei beiden Positivkontrollen ist Efg1 als Dreifachbande zu erkennen, wobei in diesem Fall bei CAI4 die instabile, obere Bande nicht zu erkennen ist. Ein Vergleich der unbehandelten mit der Phosphatase-behandelten Probe jeder Efg1-Variante macht deutlich, dass sämtliche Varianten bis auf D4 und D5 nach Dephosphorylierung ein verändertes Laufverhalten aufweisen. Zudem kann bei den dephosphorylierten Proben teilweise eine partielle Degradierung von Efg1 beobachtet werden (z. B. Spur 28 und 30). Somit kann geschlossen werden, dass die Deletionen D4 und D5 keine Phosphorylierung aufweisen und daher diese Efg1-Regionen für eine Phosphorylierung von Efg1 benötigt werden. D4 umspannt dabei den Bereich der APSES-Domäne und D5 die Alanin- und Prolin-reiche Domäne. Die Deletionsvarianten D8 und D9, die die beiden äußeren Bereiche der APSES-Domäne entfernen, zeigen ein verändertes Laufverhalten, so dass der relevante Bereich der APSES-Domäne auf die bHLH-Domäne eingegrenzt werden kann. D10 und D11 sind Teile der Deletion 5, zeigen aber im Gegensatz zu D5 ein verändertes Laufverhalten. Eventuell zeigt dies, dass dieser Bereich nur gering phosphoryliert wird. Außerdem könnte durch Verlust der großen D5-Region die Konformation von Efg1 so verändert sein, dass deswegen keine Phosphorylierung mehr möglich, die jedoch bei den kleineren Deletionen D10 und D11 noch möglich ist.

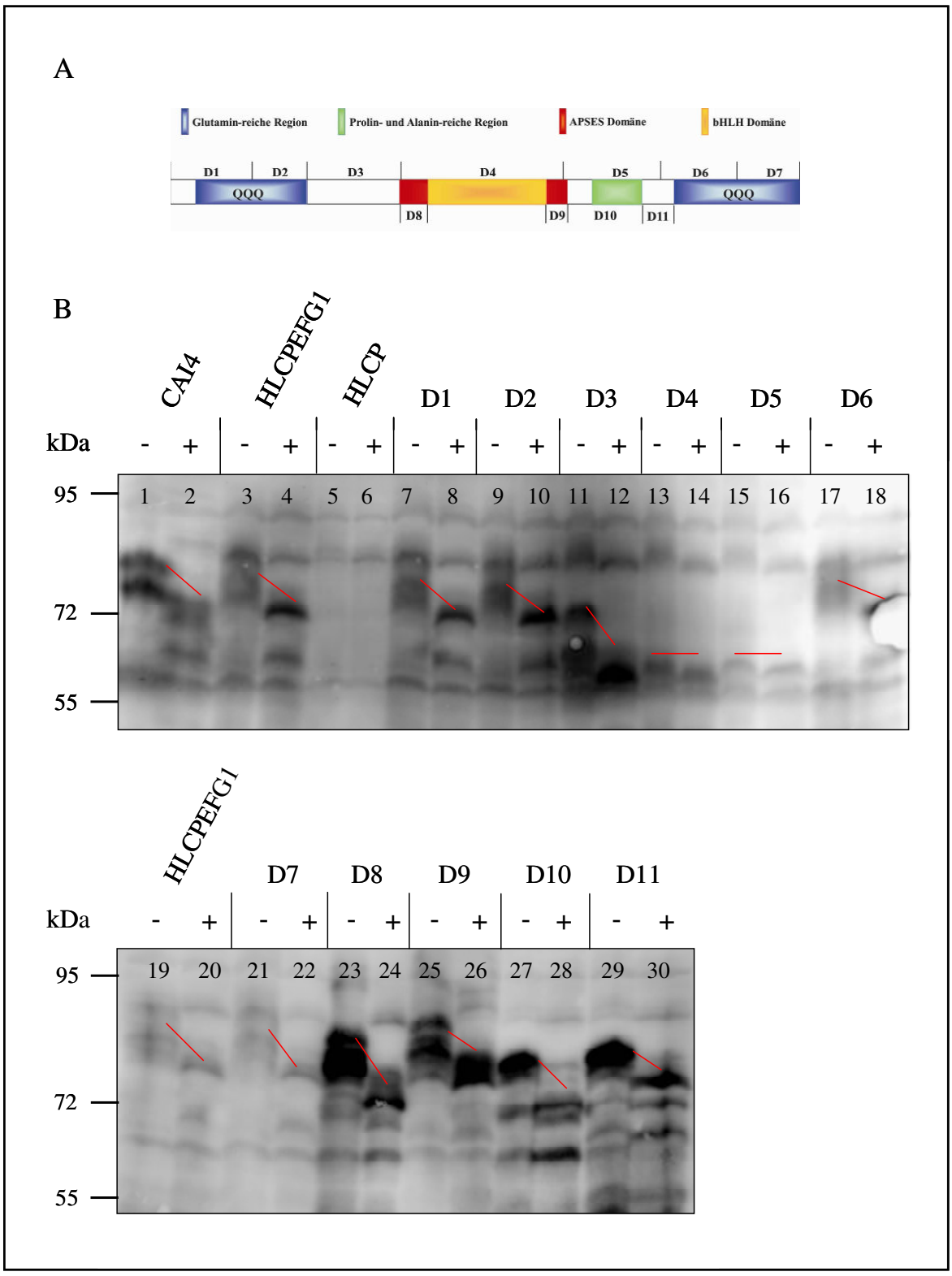


Abb. 3.22: Analyse zur Untersuchung der posttranslationalen Modifikation der Efg1-Deletionsvarianten. A: Deletionsschema der Efg1-Deletionsvarianten. B: Western-Blot-Analyse der Deletionsvarianten. Die Anzucht der Stämme erfolgte in SCAA-Medium bis zu einer OD_{600}=0,8. Je 50 µg Rohextrakt der *C. albicans*-Stämme CAI4 (*EFG1*), HLCP (*efg1*), HLCPEFG1 (HA-Efg1) und HLCPEFG1-D1 (HA-Efg1-D1) bis HLCPEFG1-D11 (HA-Efg1-D11) wurden entweder unbehandelt verwendet (Spur: -) oder mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (Spur: +) versetzt und für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Rote Striche verdeutlichen Unterschiede zwischen unbehandelter und dephosphorylierter Probe. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.4.4 Posttranslationale Modifikation von Efg1 unter hypoxischen Wachstumsbedingungen

Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist für die Regulation von ca. 50 % der unter Hypoxie regulierten Gene verantwortlich (Setiadi *et al*., 2006; Ernst und Tielker, 2009). Daher wurde der Phosphorylierungszustand von Efg1 unter hypoxischen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Rohextrakte der *C. albicans*-Stämme CAI4 (*EFG1*), HLCEEFG1 (HA-Efg1) und HLC67 (*efg1*) wurden hierfür verwendet. Wie in 3.4.1 beschrieben wurden die Proben einer Dephosphorylierung mit Lambda-Proteinphosphatase unterzogen. Aus Abb. 3.23 kann entnommen werden, dass auch unter hypoxischen Wachstumsbedingungen eine Phosphorylierung von Efg1 erfolgt. In diesem Fall werden, wie auch in 3.4.1 oder 3.4.5 zu erkennen ist, nur zwei der drei Efg1-Banden beobachtet. Somit scheint sich unter Hypoxie der Phosphorylierungszustand von Efg1 nicht zu verändern, obwohl keine Aussage zu möglichen Unterschieden zwischen normoxischen und hypoxischen Phosphorylierungsstellen gemacht werden kann.

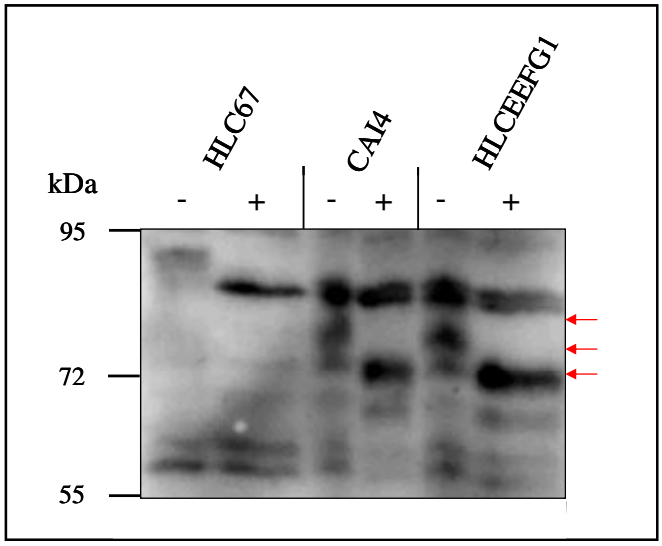


Abb. 3.23: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der posttranslationalen Modifikation unter hypoxischen Wachstumsbedingungen. Die Anzucht der Stämme erfolgte unter hypoxischen Wachstumsbedingungen (25 °C, 0,2 % O_2, 6 % CO_2). Je 50 µg Rohextrakt der *C. albicans*-Stämme CAI4 (*EFG1*), HLC67 (*efg1*) und HLCEEFG1 (HA-Efg1) wurden entweder unbehandelt verwendet (Spur: -) oder mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (Spur: +) versetzt und für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.4.5 Einfluss von Aminosäureaustauschen auf die posttranslationale Modifikation

Da angenommen wird, dass Efg1 über den Phosphorylierungszustand reguliert wird, sollte herausgefunden werden, welche Kinasen dafür verantwortlich sind. Dabei weist Efg1 an

Position 204-206 eine potentielle Zielsequenz für die Proteinkinase A (R-V-T; Kennelly und Krebs, 1991) auf. An Position 179 befindet sich die einzige unter Efg1-Homologen konservierte Zielsequenz für eine Cyclin-abhängige Kinase (Cdc28-Hgc1 (hypha-specific G1 cyclin)) (Wang *et al*., 2009).

Bei der Durchführung von Aminosäuresubstitutionen wird häufig ein Austausch gegen Alanin oder Glutamat vorgenommen. Die aliphatische Aminosäure Alanin kann nicht mehr als Phosphatakzeptor fungieren und die Regulationsmöglichkeit durch eine phosphorylierende Kinase ist nicht mehr gegeben. Die in Glutamat vorhandene negative Carboxlgruppe hingegen bewirkt eine so genannte Phosphomimic-Mutation, so dass ein permanent phosphoryliertes Protein imitiert wird. In früheren Untersuchungen (Bockmühl und Ernst, 2001) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Substitution des Threonin 206 gegen Glutamat eine hyperaktive Efg1-Variante generiert, die zu verstärkter Hyphenbildung fähig ist und auch eine *tpk*-Deletionsmutante komplementieren kann. Eine Alanin-Substitution hingegen beeinträchtigt die Ausbildung echter Hyphen auf unterschiedlichen Induktionsmedien, jedoch nicht die Pseudohyphenbildung.

Um das Phosphorylierungsmuster bzw. die Funktionalität der oben genannten Aminosäureaustausche zu überprüfen, wurden diese durch Mutagenese-PCR auf dem *E. coli* Expressionsplasmid pET19-His-Efg1Kodon und dem *C. albicans* Expressionsplasmid p-BI-1-His-Efg1 vorgenommen. Dabei wurde das jeweilige Threonin gegen Glutamat ausgetauscht, wodurch ein permanent phosphoryliertes Efg1 imitiert wurde. Somit sollte die bisher schwache Bindefähigkeit der Efg1-Varianten in Gelretardierungsversuchen verbessert werden. Es wurde jeweils das Primerpaar bestehend aus T179Efor und T179Erev für den Austausch des Threonin 179 und das Primerpaar T206Efor und T206Erev für den Austausch des Threonin 206 verwendet. Die korrekte Substitution wurde durch Sequenzierung mit dem Primer pET-RP für das *E. coli*-Plasmid und dem Primer p-BI-1-His-Efg1seq für das *C. albicans*-Plasmid überprüft (GATC Biotech AG, Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden zur Untersuchung der posttranslationalen Modifikation die *C. albicans*-Plasmide p-BI-1-His-Efg1T179E und p-BI-1-His-Efg1T206E in die *efg1*-Mutante HLC67 transformiert.

Je 50 µg Rohextrakt wurden mit Lambda-Proteinphosphatase dephosphoryliert bzw. unbehandelt für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. In Abb. 3.24 ist zu erkennen, dass bei der Positivkontrolle CAI4, Efg1 als Dreifachbande detektiert werden kann, wobei die obere und die untere Bande eine sehr geringe Intensität zeigen. Die zweite Positivkontrolle HLC67[p-BI-1-His-Efg1] (His-Efg1) weist ebenfalls das ungewöhnliche Laufverhalten auf, dabei ist auf Grund der Histidin-Epitopmarkierung von Efg1 die Laufhöhe ein wenig nach oben verschoben. Die beiden Varianten mit den Aminosäureaustauschen zeigen keinen Unterschied zu den Positivkontrollen, so dass daraus geschlossen werden kann, dass Efg1 wahrscheinlich mehrfach phosphoryliert ist und dass weitere Phosphorylierungen durch andere unbekannte Kinasen vorgenommen werden.

Des Weiteren wurden die Aminosäuresubstitutions-Varianten auf ihre Fähigkeit der DNA-Bindung untersucht. Hierzu wurden diese heterolog in *E. coli* exprimiert und durch

Metallaffinitätschromatographie (2.6.13.1) gereinigt. Das gereinigte Protein wurde anschließend in Gelretardierungsexperimenten (2.6.9) eingesetzt. Dabei waren beide Varianten in der Lage ein 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors zu binden und zu verzögern (Daten nicht gezeigt). Somit scheint der Aminosäureaustausch keinen positiven Einfluss auf die DNA-Bindefähigkeit zu haben.

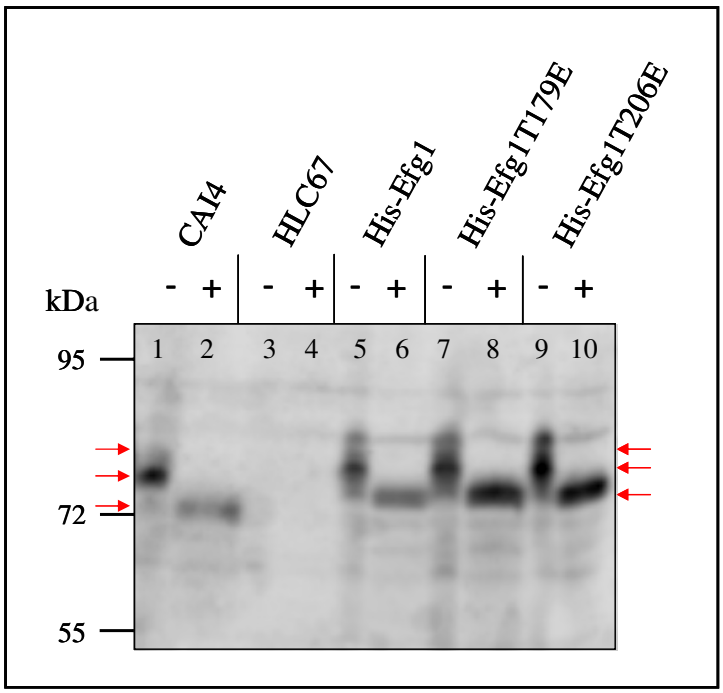


Abb. 3.24: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von Aminosäureaustauschen auf die posttranslationale Modifikation. Die Anzucht der Stämme erfolgte in YPD-Medium (CAI4, HLC67) oder in SCAA-Medium bis zu einer OD_{600}=0,8. Je 50 µg Rohextrakt der *C. albicans*-Stämme wurden entweder unbehandelt verwendet (Spur: -) oder mit 1,5 µl Lambda-Proteinphosphatase (Spur: +) versetzt und für 60-90 min bei 30 °C inkubiert. Rote Pfeile verdeutlichen die Position der drei Efg1-Banden. Die Western-Blot-Analyse wurde wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.5 Bedeutung des Cystein 218 für die Funktion von Efg1

In der Aminosäuresequenz von Efg1 befindet sich nur ein einziges Cystein an Position 218. Um den Einfluss dieses Cysteins auf die Funktion von Efg1 zu untersuchen, wurde dieses Cystein (Kodon: TGC) durch Mutagenese-PCR gegen ein Alanin (Kodon: GCT) ausgetauscht und es wurden unterschiedliche Komplementationstests zur Analyse der Funktionalität durchgeführt. Zudem soll in zukünftigen Versuchen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Konformationsänderungen oder auch zur Analyse der Interaktion von Proteinen mit spezifischen DNA-Sequenzen eine Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Messung (FRET) durchgeführt werden. Daher sollte auch die mögliche Markierung von Efg1 mit einem Chromophor an dem Cystein 218 durch den C218A-Austausch untersucht werden. Vorgenommen wurde dieser Aminosäureaustausch auf dem Plasmid pTD38-HA, welches ein

EFG1-Gen (*HA-EFG1*) enthält, das für ein Hämaglutinin-Epitop (HA) markiertes Efg1 kodiert und unter Kontrolle des *EFG1*-Promotors steht. Für die Mutagenese wurde das Primerpaar EfgCyshin und EfgCysher verwendet und der korrekte Aminosäureaustausch wurde durch Sequenzierung mit dem Primer CysSeq überprüft (GATC Biotech AG, Daten nicht gezeigt). Das so generierte Plasmid wurde pDK9 benannt. Abb. 3.25 B zeigt einen Ausschnitt der DNA- und Peptid-Sequenz von Efg1. Die Position des auszutauschenden Kodons und die entsprechenden Mutagenese-Primer sind schematisch dargestellt. Abb. 3.25 A verdeutlicht zudem die Lage des Cysteins-218 innerhalb von Efg1. So befindet sich das

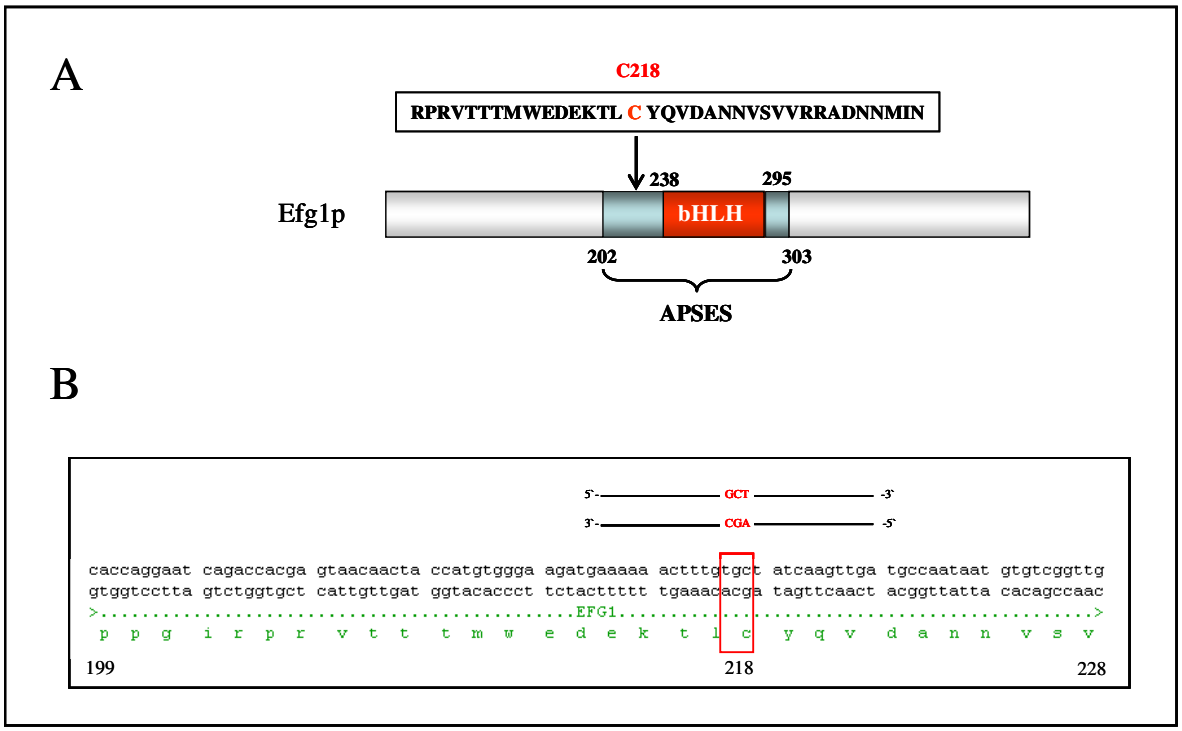


Abb. 3.25: Aminosäureaustausch für Komplementationstests. A: Schematische Darstellung der C218-Position innerhalb der APSES-Domäne von Efg1. B: Ausschnitt der DNA- und Peptid-Sequenz von Efg1. Das einzige Cystein (TGC) wurde per Mutagenese-PCR gegen ein Alanin (GCT) ausgetauscht. Die ursprüngliche DNA-Sequenz ist in schwarz dargestellt, die dazugehörige Peptid-Sequenz in grün. Rot umrandet ist das auszutauschende TGC-Kodon dargestellt. Position und Sequenz der Mutagenese-Primer sind schematisch dargestellt.

Cystein zwar in der APSES-Domäne, jedoch nicht in der bHLH-Domäne von Efg1. Um eine Aussage über die Funktionalität des modifizierten Proteins machen zu können, wurde das Plasmid pDK9 im *EFG1*-Promotor mit dem Restriktionsenzym *Pac*I linearisiert und über homologe Rekombination in den *EFG1*-Promotor der *efg1*-Mutante (HLC67) integriert (Stamm HLC67[pDK9]). Es wurden jeweils 4-6 unterschiedliche Transformanden für die Analyse verwendet. Das Ausgangsplasmid pTD38-HA wurde ebenfalls transformiert (Stamm HLCEEFG1), um einen Einfluss des Plasmids ohne Aminosäureaustausch ausschließen zu können. Für den Vergleich wurden dementsprechend die Uracil-prototrophen Stämme CAF2-1 (*EFG1*) und HLC52 (*efg1*-Mutante) verwendet.

3.5.1 Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung bei Normoxia

Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist entscheidend an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt, da eine Mutation des *EFG1*-Gens unter normoxischen Induktionsbedingungen zu einem Verlust der Hyphenbildung führt (Lo *et al.*, 1997). Daher wurde ein möglicher Einfluss des Cystein-218-Restes auf die Hyphenbildung unter verschiedenen Induktionsbedingungen untersucht. Um die Fähigkeit zur Hyphenbildung der Transformante mit dem C218A-Austausch zu testen, wurden die Zellen in 10 ml YP-Medium auf eine OD_{600}=0,2 inokuliert und die Hypheninduktion wurde durch Zugabe von 10 % Pferdeserum und Inkubation für 2 h bei 37 °C induziert. Anschließend wurden Zellen auf ihre Morphologie mikroskopisch untersucht, wobei Septen und Knospungsnarben durch Calcofluor White angefärbt wurden. Wie zu erwarten, zeigte die Positivkontrolle CAF2-1 hyphales Wachstum und in die echten Hyphen nachträglich eingezogene Septen waren zu erkennen. Die *efg1*-Mutante war hingegen nicht fähig, Hyphen auszubilden und zeigte lediglich ein Hefe-Wachstum. Der Stamm mit dem Ausgangsplasmid pTD38-HA (HA-markiertes Efg1) war ebenfalls wie der Wildtyp in der Lage, Hyphen auszubilden. Somit scheint die Epitopmarkierung keinen Einfluss auf die Hyphenbildung in Flüssigmedium zu haben. Die Efg1-Variante mit dem C218A-Aminosäureaustausch zeigte analog zum Wildtyp und zum Ausgangsplasmid die Ausbildung von echten Hyphen. Um einen eventuellen Einfluss auf die Quantität der gebildeten Hyphen zu untersuchen, wurde zudem die Hyphenanzahl zu bestimmten Zeitpunkten nach Hypheninduktion bestimmt. Aus Abb. 3.26 B ist jedoch zu entnehmen, dass bei allen untersuchten Stämmen kein Unterschied hinsichtlich der gebildeten Hyphenzahl festgestellt werden konnte. Daher scheint der Cystein-Austausch die Hyphenbildung in Flüssigmedium nicht zu beeinflussen.

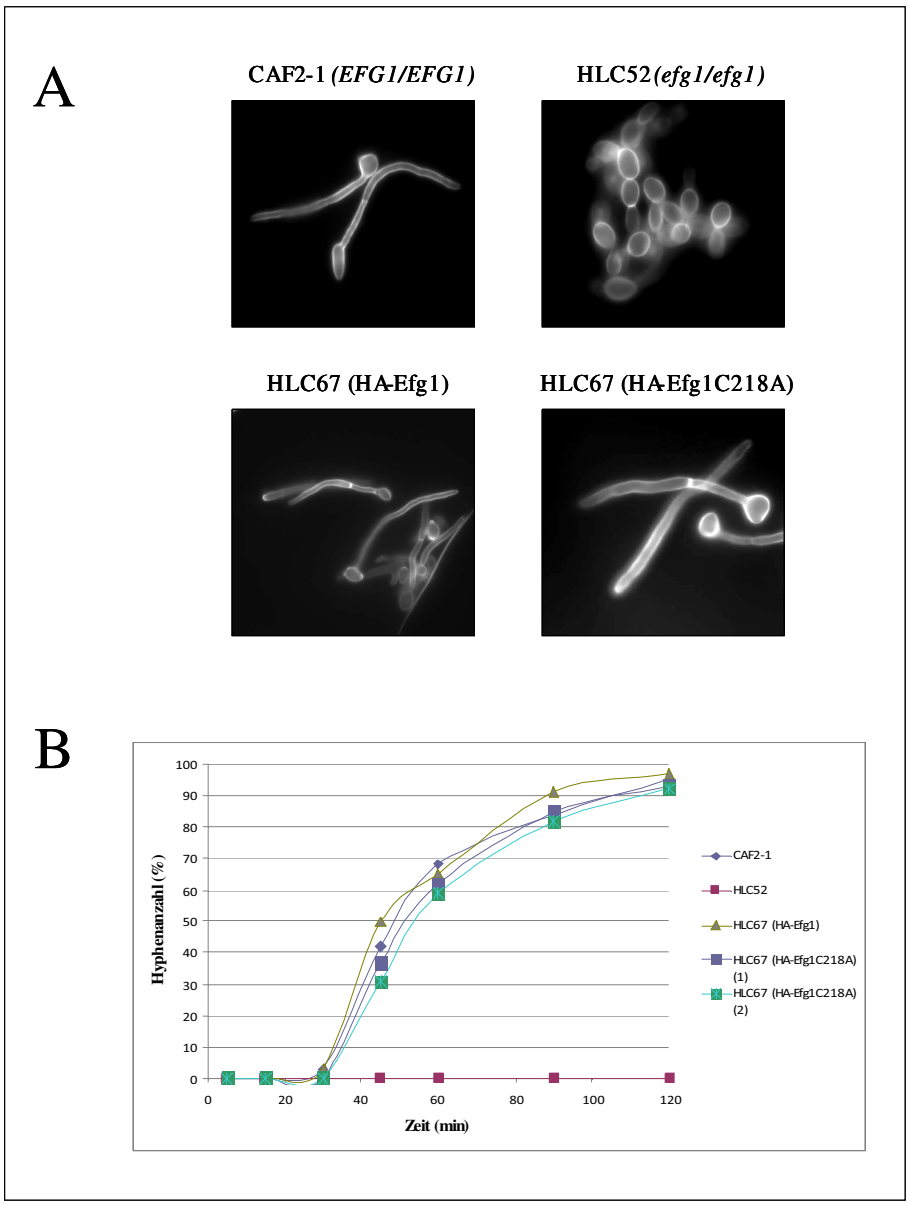


Abb. 3.26: Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung in flüssigem Medium. Die Anzucht der Zellen erfolgte in YP-Medium. Die Hypheninduktion wurde durch Zugabe von 10 % Pferdeserum und Inkubation bei 37 °C für 120 min induziert. Als Positivkontrolle diente der Stamm CAF2-1 (*EFG1*) und als Negativkontrolle der Stamm HLC52 (*efg1*). A: Zur mikroskopischen Untersuchung der Zellen wurde eine Calcofluor-Färbung durchgeführt. B: Quantifizierung der Hyphenbildung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hypheninduktion.

Die Fähigkeit zur Hyphenbildung wurde außerdem bei Wachstum auf festen Nährmedien untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Induktionsmedien verwendet. Zum einen wurde die Hyphenbildung auf Agar bestehend aus YP-Medium + 10 % Pferdeserum getestet. Die Zellen wurden vereinzelt, drei Tage bei 37 °C inkubiert und fotografisch dokumentiert (Abb. 3.27 A). Zum anderen wurde die Hyphenbildung auf YPM-Platten untersucht, welche 2 % Mannitol statt Glukose als Kohlenstoffquelle enthalten (Abb. 3.27 B). Es wurde ebenfalls bei 37 °C für drei Tage inkubiert. Auch hier war der wildtypische *C. albicans* Stamm CAF2-1 in der Lage, filamentös zu wachsen, während bei der *efg1*-Mutante HLC52 nur ein Wachstum

in der Hefe-Wachstumsform beobachtet werden konnte. Die Stämme mit integriertem Ausgangsplasmid und dem Plasmid mit dem Aminosäureaustausch entsprachen auf beiden festen Induktionsmedien dem Phänotyp des Wildtyps und zeigten filamentöses Wachstum. Somit hat die HA-Epitopmarkierung und der C218A-Austausch auch auf festen Induktionsmedien keinen Einfluss auf die Hyphenbildung.

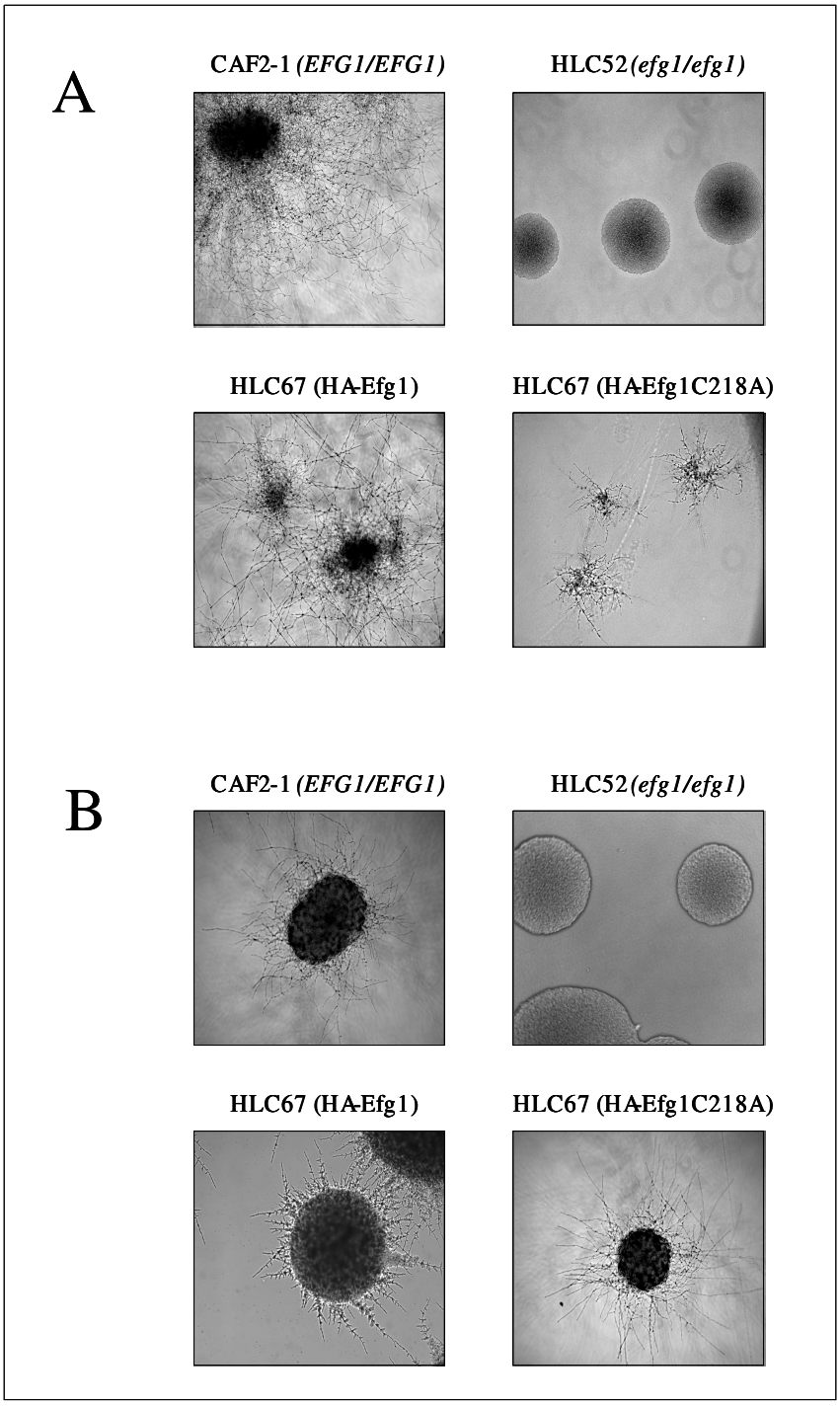


Abb. 3.27: Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung bei festen Nährmedien. Die Inkubation erfolgte jeweils für drei Tage bei 37 °C. Als Positivkontrolle diente der Stamm CAF2-1 (*EFG1*) und als Negativkontrolle der Stamm HLC52 (*efg1*). A: Hyphenbildung auf Agar bestehend aus YP-Medium + 10 % Pferdeseum. B: Hyphenbildung auf YPM-Platten (2 % Mannitol).

3.5.2 Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung bei Hypoxie

Je nach Wachstumsbedingungen zeigt Efg1 eine bivalente Funktion entweder als Aktivator oder Repressor der Hyphenbildung. Bei sauerstoffarmen Bedingungen führt eine Deletion von *EFG1* zu einem hyperfilamentösen Phänotyp, so dass Efg1 hierbei als Repressor der Hyphenbildung wirkt; der Wildtyp wächst unter diesen Bedingungen hauptsächlich in der Hefe-Wachstumsform (Sonneborn *et al.*, 1999b; Setiadi *et al.*, 2006). Der Einfluss des C218A-Austausches wurde auch auf die Hyphenbildung unter hypoxischen Wachstumsbedingungen untersucht, wobei zusätzlich zu den bereits verwendeten Kontrollstämmen auch der Stamm BCA0901 eingesetzt wurde, der ein heterozygoter *EFG1*/*efg1* Stamm ist, der jedoch eine unmodifizierte Efg1-Version ohne HA-*tag* synthetisiert. Dadurch konnte auch der Einfluss des HA-*tags* auf die Fähigkeit zur Hyphenbildung unter Hypoxie analysiert werden. Sämtliche Stämme wurden auf YPS-Platten, welche 2 % Saccharose enthalten, vereinzelt und für 3 Tage unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O_2, 0 % CO_2) bei 25 °C inkubiert.

Abb. 3.28 zeigt die mikroskopische Analyse der *C. albicans*-Stämme nach Wachstum unter hypoxischen Bedingungen. Es ist zu erkennen, dass sich die beiden Positivkontrollen CAF2-1 (*EFG1*/*EFG1*) und BCA0901 (*EFG1*/*efg1*) und die Negativkontrolle HLC52 (*efg1*/*efg1*) den Erwartungen entsprechend verhalten, da sie im Gegensatz zu den Efg1-produzierenden Stämmen in der Lage sind, Filamente zu bilden. Interessanterweise war jedoch auch der Stamm HLCEEFG1 mit dem Ausgangsplasmid pTD38-HA für den Aminosäureaustausch ebenfalls zu einer Hyphenbildung befähigt. Der Unterschied zwischen diesem Stamm und dem ebenfalls heterozygoten Stamm BCA0901 besteht nur in der Epitopmarkierung von Efg1. Somit kann geschlossen werden, dass die HA-Markierung von Efg1 seine Aktivität als Repressor der Hyphenbildung unter Hypoxie beeinflusst. Die fehlende Repressoraktivität von Efg1 unter hypoxischen Wachstumsbedingungen konnte auch bei einer aminoterminalen Markierung von Efg1 mit einem His-*tag* beobachtet werden (Eichhof, 2008). Die Efg1-Variante mit dem C218A-Austausch wuchs ebenfalls filamentös allerdings ist unklar, ob der Aminosäureaustausch zum Verlust der Efg1-Repressoraktivität beiträgt. Zur Klärung des Sachverhalts sollte daher der C218A-Austausch in einer *EFG1*-Version ohne HA-*tag* getestet werden.

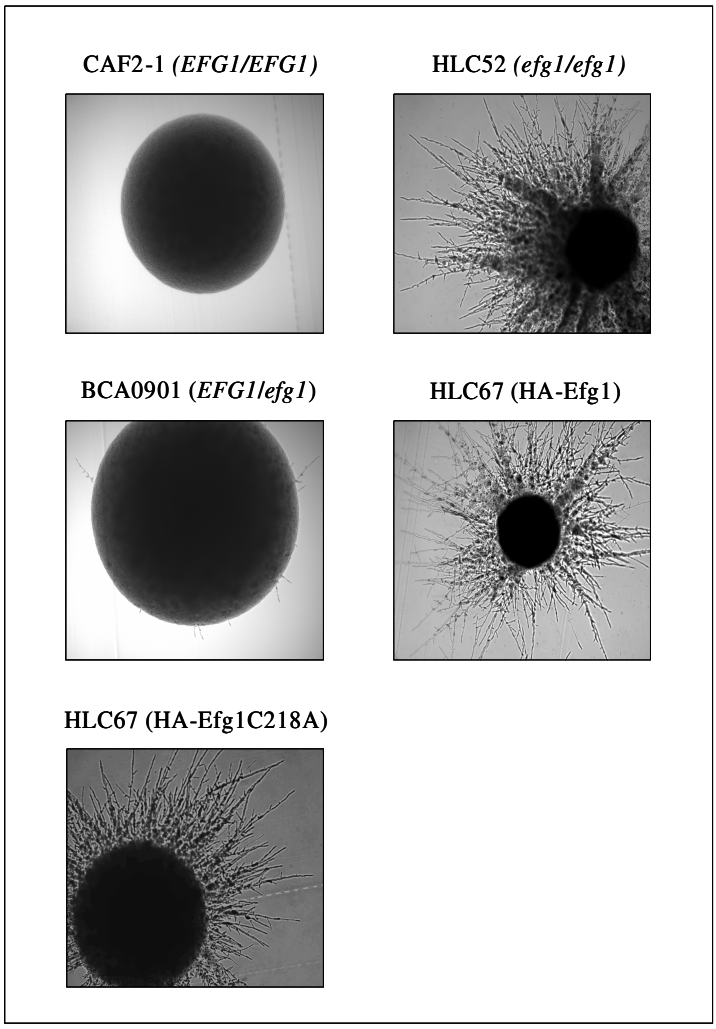


Abb. 3.28: Einfluss des Cystein-Austausches auf die Hyphenbildung unter hypoxischen Wachstumsbedingungen. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 25 °C unter Hypoxie (0,2 % O_2, 0 % CO_2) auf YPS-Platten. Als Positivkontrolle dienten die Stämme CAF2-1, BCA0901 und als Negativkontrolle der Stamm HLC52.

3.5.3 Einfluss des Cystein-Austausches auf die Chlamydosporenbildung

Eine weitere charakteristische Wachstumsform von *C. albicans* stellen die Chlamydosporen dar. Diese bilden sich an der Spitze von hyphalen Zellen aus und dienen wahrscheinlich zur Überdauerung. Die wichtige Funktion von Efg1 für die Ausbildung von Chlamydosporen zeigt sich in dem Verlust der Chlamydosporenausbildung in einer *efg1*-Mutante (Sonneborn *et al.*, 1999a). Der Einfluss des Cystein-Austausches auf die Chlamydosporenbildung wurde durch Vereinzelung der Zellen auf Maismehlagar-Platten mit 0,5 % Tween 80 und Inkubation für fünf Tage bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss untersucht. Um eine mikroaerobe Umgebung zu schaffen, wurden die Agarplatten mit sterilen Deckgläsern abgedichtet. In Abb. 3.29 sind durch schwarze Pfeile exemplarisch die gebildeten Chlamydosporen angedeutet. Der Wildtyp, der Stamm mit integriertem Ausgangsplasmid mit HA-markiertem Efg1 und der

Stamm mit dem C218A-Aminosäureaustausch sind alle in der Lage, an den Hyphenspitzen Chlamydosporen auszubilden. Die *efg1*-Mutante zeigte zwar ein filamentöses Wachstum, jedoch keine Bildung von Chlamydosporen. Die Chlamydosporenbildung wird also weder durch den C218A-Austausch noch durch den HA-*tag* von Efg1 beeinflusst.

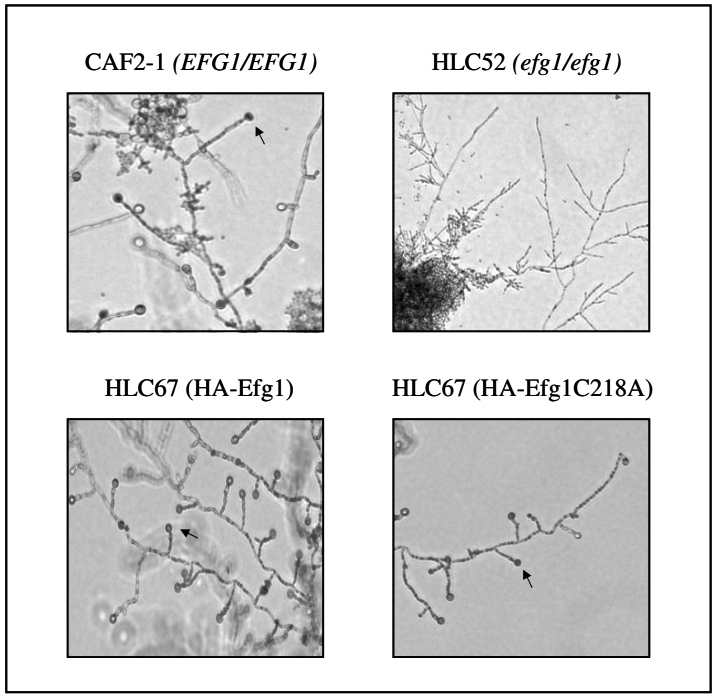


Abb. 3.29: Einfluss des Cystein-Austausches auf die Chlamydosporenbildung. Zur Induktion wurden die Zellen auf Maismehlagar-Platten mit 0,5 % Tween 80 vereinzelt, mit sterilen Deckgläsern abgedichtet und bei RT für fünf Tage inkubiert. Schwarze Pfeile zeigen einzelne Chlamydosporen.

3.6 Untersuchungen zur DNA-Bindespezifität von Efg1

Die vielfältigen Funktionen von APSES-Proteinen werden durch Bindung an spezifische DNA-Bindemotive vermittelt. Dabei wird vermutlich die eigentliche DNA-Bindung über den basischen Bereich des bHLH-Motivs vorgenommen, während der HLH-Bereich z. B. an der Dimerisierung beteiligt sein könnte. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Efg1 sein eigenes Transkript durch negative Autoregulation reguliert und dieses konnte unter anderem durch Northernanalysen und durch Real time-PCR bestätigt werden (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003; Lassak, pers. Mitteilung). Durch eine Chromatinimmunpräzipitations-Analyse konnte anschließend eine Bindung von Efg1 im *EFG1*-Promotor festgestellt werden (Doedt, 2003). In Gelretardierungsexperimenten konnte bereits mit aus *E. coli* isoliertem Efg1 eine schwache Bindung an ein 408 bp-Fragment (Abb. 3.30) des *EFG1*-Promotors gezeigt werden. (Bußmann, 2006). Eine Bindung von Efg1 an ein 313 bp-Promotorfragment (Abb. 3.30) konnte nicht nachgewiesen werden (Doedt, 2000). In

dieser Arbeit sollte mit Efg1 aus *C. albicans* die Bindung an das 408 bp-Promotorfragment untersucht werden, um eventuell eine Verbesserung der Probenbindung zu bewirken.

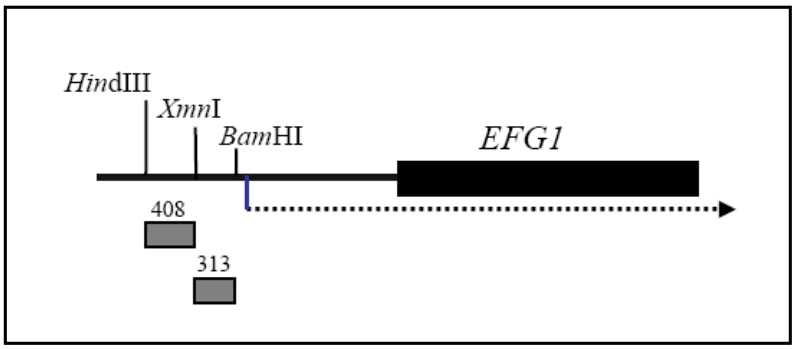


Abb. 3.30: Schematische Darstellung des *EFG1*-Promotors. Die für *EFG1* kodierende Region ist als schwarzer Kasten dargestellt. Graue Kästen zeigen die in Gelretardierungsversuchen untersuchten Fragmente des *EFG1*-Promotors.

3.6.1 Bindung von Efg1 aus *C. albicans* Rohextrakten an ein 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors

In Gelretardierungsexperimenten sollte die Bindung von Efg1 aus *C. albicans* an ein 408 bp-*Hin*dIII-*Xmn*I-Fragment des *EFG1*-Promotors überprüft werden (Abb. 3.31). Interessanterweise beinhaltet dieses Fragment eine dreifache Sequenzwiederholung des Palindroms TATGCATA, welche ein potentielles DNA-Bindemotiv von Efg1 darstellen könnte. Dieses Palindrom ist Teil einer 13 bp-langen Region die in einer Footprint-Analyse als Binderegion von Efg1 identifiziert werden konnte (Bußmann, 2006). Abb. 3.31 zeigt eine Übersicht über das verwendete Promotorfragment mit darin vorhandenen drei ARE-Motiven. Außerdem sind unterstrichen die in 3.6.2 und 3.6.3 verwendeten Deletionsvarianten gezeigt.

Abb. 3.31: Sequenzausschnitt eines 408 bp-Fragments des *EFG1*-Promotors. Durch farbige Linien unterlegt sind die bei den jeweiligen Deletionsvarianten fehlenden Bereiche. Die drei vorhandenen ARE-Motive sind grün dargestellt und jeweils mit einem Kasten versehen.

Das zu untersuchende DNA-Fragment wurde durch PCR aus dem Plasmid pTD26 mit dem Primerpaar 408for und 408rev amplifiziert. Der *C. albicans*-Wildtypstamm (CAI4) und der Stamm HLCEEFG1, welcher ein Epitop markiertes *EFG1*-Gen (*EFG1*-HA) trägt, wurden in YPD-Medium angezogen und anschließend zur Isolierung von Rohextrakten verwendet. Es wurden je 5 bzw. 10 µg der hergestellten Rohextrakte pro Reaktionsansatz eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde durch die T4-Polynukleotidkinase radioaktiv mit γ-[32P]-ATP markiert. Zum Abfangen unspezifischer Bindungen enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich 1 µg poly(dI-dC) x poly(dI-dC) als unspezifischen Kompetitor. Zur Überprüfung, ob eine beobachtete Verzögerung durch ein Bindung von HA-Efg1 an das 408 bp-Fragment zustande kommt, wurde als spezifischer Kompetitor das unmarkierte 408 bp-Fragment in einem 100 fachen Überschuss zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Als unspezifischer Kompetitor wurde, ebenfalls in einem 100 fachen Überschuss, ein 313 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors verwendet. Dieses wurde durch PCR mit dem Primerpaar 313for und 313rev aus dem Plasmid pTD26 amplifiziert. Für „Supershift"-Analysen wurde je 1 µl Anti-HA Antikörper eingesetzt. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 20-30 min bei Raumtemperatur wurden die Proben in einem 16 cm langen, 8 % igen, nativen Polyacrylamidgel bei 150 Volt für 2-3,5 h aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und durch Autoradiographie (Abb. 3.32) ausgewertet.

Es ist zu erkennen, dass nach Zugabe des HLCEEFG1-Rohextraktes ein verzögerter Komplex beobachtet werden kann. Dieser Komplex erscheint allerdings nicht als distinkte Bande, sondern als diffuses Signal, was auf eine schwache Probenbindung hindeutet. Zur Überprüfung, ob es sich bei dem bindenden Protein aus dem Rohextrakt um Efg1 handelt, wurde eine „Supershift"-Analyse durchgeführt. Dabei ist in Spur 5 deutlich eine weitere Verzögerung des Komplexes festzustellen. Außerdem scheint der zugegebene Antikörper den Protein-DNA-Komplex zu stabilisieren, da insgesamt eine stärkere Intensität des Signals ersichtlich ist. Im Gegensatz dazu, konnte bei Zugabe des Anti-HA-Antikörpers zum nicht-Epitop-markierten Efg1 des CAI4-Rohextraktes, kein „Supershift" beobachtet werden. Bei Zugabe von unspezifischem Kompetitor kann kein Unterschied in der Verzögerung festgestellt werden. Die Zugabe von spezifischem Kompetitor hingegen führte zu einem Rückgang der Verzögerung. Alle erhaltenen Ergebnisse sprechen somit für eine Bindung von Efg1 aus einem *C. albicans* Rohextrakt an das 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors.

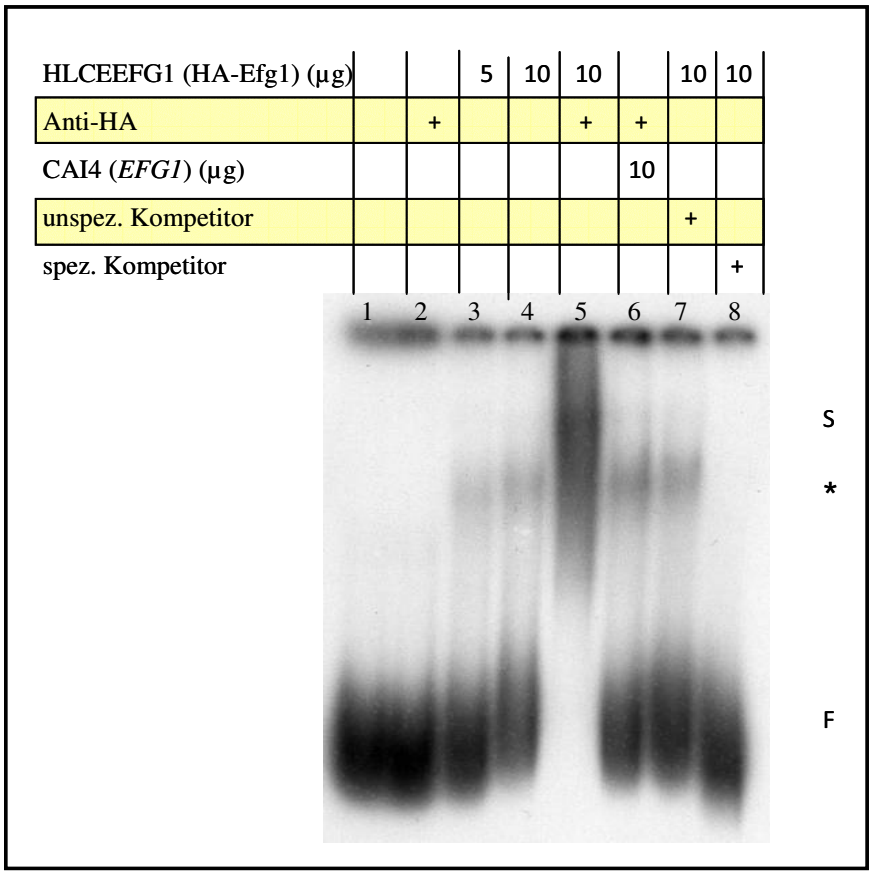


Abb. 3.32: Gelretardierung mit Efg1 und einem 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors. ^{32}P-markierte DNA wurde mit Rohextrakten der Stämme HLCEEFG1 (HA-Efg1) bzw. CAI4 (*EFG1*) in einem Bindungsassay auf ein 8 % PAA/TBE-Gel aufgetragen und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. S: „Supershift"; *: verzögerter Protein-DNA-Komplex; F: freie DNA. Spur 1 zeigt die freie DNA (408 bp), Spur 2: die AK-Kontrolle mit 1 µl Anti-HA-Antikörper + DNA, Spur 3: ca. 5 µg HLCEEFG1 Rohextrakt + DNA, Spur 4: ca. 10 µg HLCEEFG1 Rohextrakt + DNA, Spur 5: ca. 10 µg HLCEEFG1 Rohextrakt + DNA + Anti-HA-Antikörper, Spur 6: ca. 10 µg CAI4 Rohextrakt + DNA + Anti-HA-Antikörper, Spur 7: ca. 10 µg HLCEEFG1 Rohextrakt + unspezifischer Kompetitor (100 x Menge an 313 bp-Fragment), Spur 8: ca. 10 µg HLCEEFG1 Rohextrakt + spezifischer Kompetitor (100 x Menge an unmarkiertem 408 bp-Fragment).

3.6.2 Bindung von Efg1 an das APSES response element (ARE) in *S. cerevisiae*

Zur Analyse der Bindung von Efg1 an die ARE-Motive des 408 bp-Promotorfragments sollte eine *in vivo* Ein-Hybrid-Analyse in *S. cerevisiae* durchgeführt werden. Dabei wurde ein System verwendet, in dem das zu analysierende DNA-Fragment in den Promotorbereich eines Reportergens integriert wurde und so die Bindung an verschiedene DNA-Sequenzen untersucht werden konnte. Für die Ein-Hybrid-Analyse in *S. cerevisiae* mussten dazu zwei Plasmide kotransformiert werden. Da Efg1 in *S. cerevisiae* keine regulatorische Fähigkeit besitzt, wurde ein Fusionsprotein aus Efg1 und der Gal4-Aktivierungsdomäne verwendet, das

durch den *ADH1*-Promotor konstitutiv exprimiert wird und auf dem Plasmid pDB16 enthalten ist. Das Plasmid pYC7 kodiert für das unter der Kontrolle des minimalen *CYC1*-Promotors stehende *lacZ*-Reportergen. In den *CYC1*-Promotor wurden die zu testenden Bindesequenzen einkloniert.

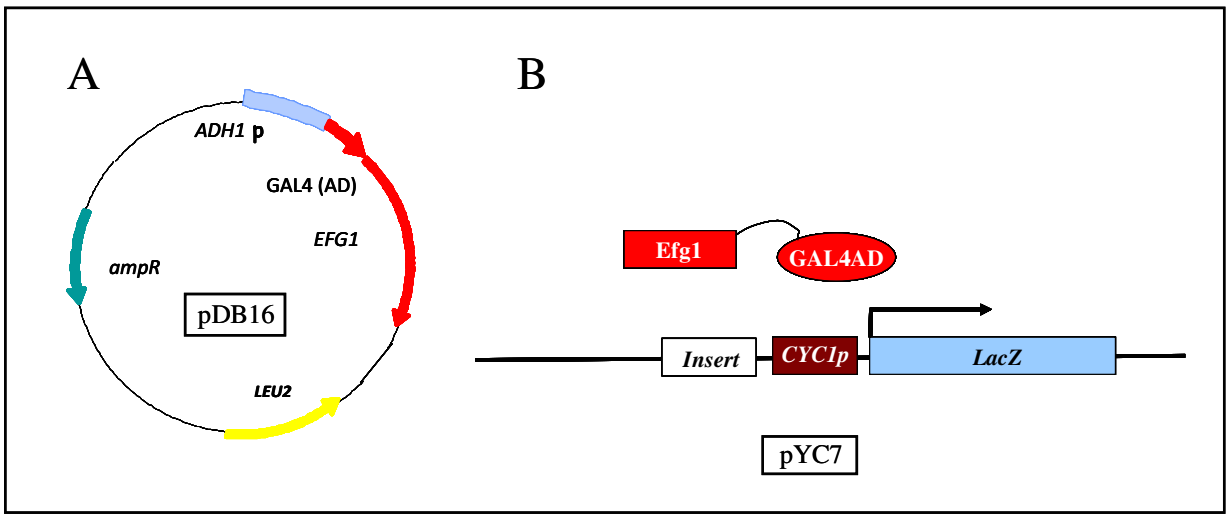


Abb. 3.33: Ein-Hybrid-System zur Untersuchung der Bindung von Efg1 an verschiedene Varianten des 408 bp-Fragments des *EFG1*-Promotors. A: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids pDB16. B: Schematische Darstellung des Plasmids pYC7 mit dem verwendeten Reportergen und dem Fusionsprotein aus Efg1 und der Gal4-Aktivierungsdomäne.

Zur Integration des vollständigen 408 bp-Fragments wurde dieses mit dem Primerpaar 408XhoIfor und 408XhoIrev aus dem Plasmid pTD26 amplifiziert, einer Restriktion mit *Xho*I unterzogen und in das ebenfalls mit *Xho*I linearisierte Plasmid pYC7 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde pDK10 benannt. Es wurde eine erfolgreiche Testrestriktion mit *Pac*I und *Sac*I vorgenommen. Da es sich um ein dreifaches Palindrom handelt, sollte zudem nur eine einzelne Version des ARE-Motivs untersucht werden. Hierzu wurde mit dem Primerpaar OH1hin und OH1her ein 408 bp-Fragment mit nur einem ARE-Motiv generiert. Dieses wurde ebenfalls mit *Xho*I geschnitten und in das linearisierte pYC7-Plasmid ligiert (Plasmid pDK11). Zur Deletion sämtlicher drei ARE-Motive (Plasmid pDK12) wurde mit dem Primerpaar 3xR-Box*BglII*insertFor und 3xR-Box*BglII*insertRev eine PCR auf pDK10 vorgenommen. Bei näherer Betrachtung der Sequenz des 408 bp-Fragments konnten zudem noch vier weitere ARE-ähnliche Motive entdeckt werden. Basierend auf pDK12 mit deletierten ARE-Motiven, wurden daher anschließend durch Mutagenese-PCR drei weitere Deletionsvarianten hergestellt. Zur Herstellung von Deletionsvariante 1 (Plasmid pDK13) wurde das Primerpaar Efg1-408bp-Muta1for und Efg1-408bp-Muta1rev verwendet, für Deletionsvariante 2 (Plasmid pDK14) die Primer Efg1-408bp-Muta2for und Efg1-408bp-Muta2rev und für Deletionsvariante 3 (Plasmid pDK15) die Primer Efg1-408bp-Muta 3for und Efg1-408bp-Muta3rev. Abb. 3.31 zeigt eine Übersicht über die Sequenz des 408 bp-Fragments und die unterschiedlichen 408 bp-Versionen, die durch Sequenzierung mit dem Primer 5-lacZ/raus überprüft wurden (GATC Biotech AG, Daten nicht gezeigt).

Jedes der Plasmide pDK10-pDK15 wurde jeweils zusammen mit dem Plasmid pDB16 in den *S. cerevisiae*-Stamm BY600 transformiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur den Leervektor pYC7 ohne Insert sowie pDB16 enthielten. Als Positivkontrolle diente pYC7 mit integriertem Plasmid pMCB, das ein 3 x MCB-Element der Sequenz ACGCGT enthält, für das eine Bindung durch Efg1 in einem Ein-Hybrid-Experiment bereits gezeigt werden konnte (Doedt, 2000). Um zu beweisen, dass die Aktivierung des Reportergens auf die spezifische Bindung durch Efg1 zurückgeht, wurden als zusätzliche Negativkontrollen Plasmide pDK10-pDK15 mit dem Plasmid pGADc1 kotransformiert, welches nur für die Gal4-Aktivierungsdomäne ohne Efg1 kodiert.

Zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden ein X-Gal-Overlay (Daten nicht gezeigt) und ein β-Galaktosidase-Flüssigtest durchgeführt. Die Anzucht der unterschiedlichen Konstrukte erfolgte in SD-ura$^-$-leu$^-$-Flüssigmedium. In Abb. 3.34 ist das Ergebnis des ONPG- Flüssigtests dargestellt. Wie zu erkennen ist, bewirkte die Insertion des

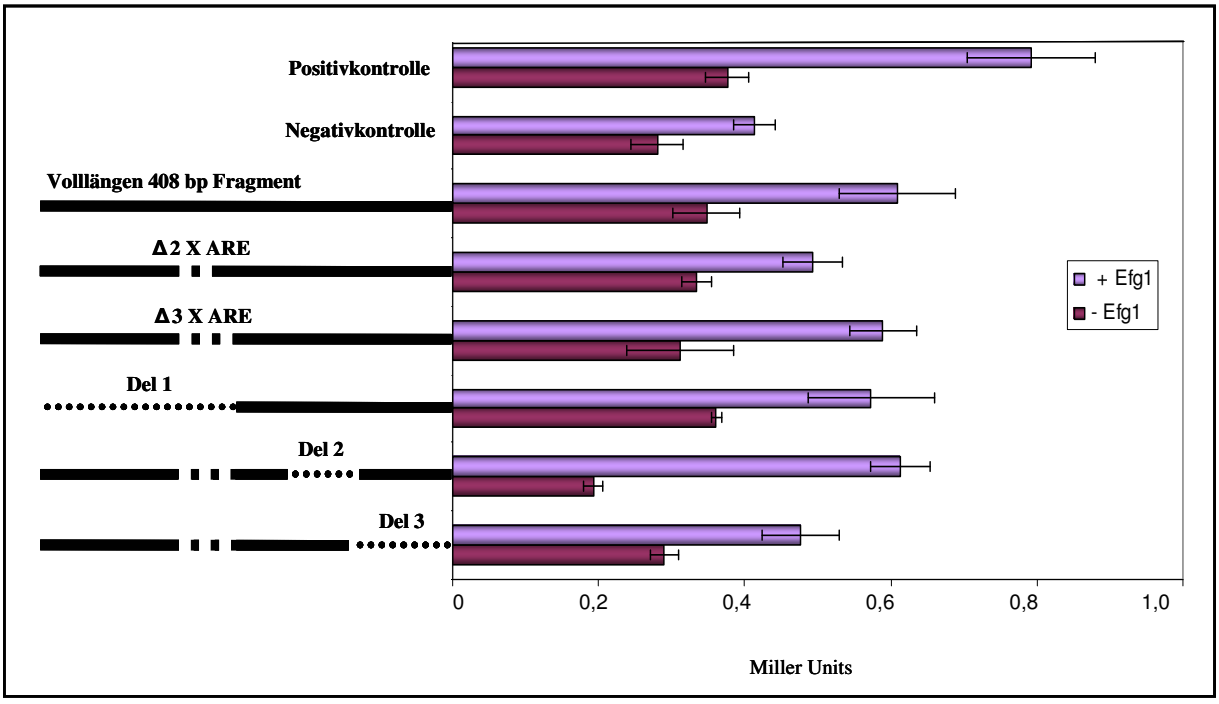


Abb. 3.34: Aktivierung der β-Galaktosidase-Expression der verschiedenen Deletionsvarianten. Es wurden jeweils 3 Transformanten jedes Konstrukts, der Negativ- (pYC7) sowie Positivkontrolle (pMCB) in SD-ura$^-$-leu$^-$-Flüssigmedium angeimpft und ihre β-Galaktosidase-Aktivität in Miller-Units in einem β-Galaktosidase-Flüssig-Assay bestimmt. Das Diagramm zeigt jeweils die Mittelwerte der 3 Transformanten. Positivkontrolle: pMCB; Negativkontrolle: pYC7; Vollängen 408 bp Fragment: pDK10; Δ 2 x ARE: pDK11; Δ 3 x ARE: pDK12; Del 1: pDK13; Del 2: pDK14; Del 3: pDK15. (+) Efg1: pDB16; (-) Efg1: pGADc1.

vollständigen 408 bp-Fragments eine Steigerung der β-Galaktosidase-Aktivität auf 0,61 Miller Units im Vergleich zu den Negativkontrollen pYC7 mit 0,41 Miller Units und dem pGADc1-Plasmid ohne Efg1, nur mit der Gal4-Aktivierungsdomäne und einer Aktivität von 0,35 Miller Units. Dieses Ergebnis bestätigt somit, dass Efg1 das 408 bp-Promotorfragment des *EFG1*-Promotors binden kann. Allerdings konnte die Vermutung, dass es sich bei dem 3 x

ARE-Motiv um das einzige Efg1-Bindemotiv handelt, nicht direkt bestätigt werden. So hatte eine Deletion des dreifachen Palindroms (Δ 3 x ARE, pDK12) innerhalb des gesamten Promotorfragments keine Auswirkung auf die β-Galaktosidase-Aktivität, da lediglich ein geringer Abfall der Aktivität auf einen Wert von 0,59 Miller Units zu verzeichnen war. Auch das Vorhandensein einer einzelnen Version des Palindroms (Δ 2 x ARE, pDK11) bewirkte mit einer Aktivität von 0,52 Miller Units keine signifikante Aktivitätsänderung. Die Deletionsvarianten 1/2/3, welche basierend auf dem Δ 3 X ARE Plasmid konstruiert wurden, wiesen ebenfalls in etwa die gleiche Aktivitätsstärke auf wie das komplette 408 bp-Fragment. Lediglich bei Del2 konnte eine stärkere Differenz von 0,19 Miller Units zwischen den Plasmiden mit und ohne Efg1 beobachtet werden.

3.6.3 Bindung von gereinigtem Efg1 aus *C. albicans* an Varianten des 408 bp-Fragments des *EFG1*-Promotors

Die in Abb. 3.34 gezeigten Ergebnisse konnten durch Gelretardierungsexperimente bestätigt werden. In Abb. 3.35 ist exemplarisch die Gelretardierung mit dem Δ 3 x ARE DNA-Fragment gezeigt. Die hier erhaltenen Ergebnisse konnten bei allen getesteten 408 bp-Varianten in gleichem Maße beobachtet werden. Zur Amplifikation der DNA-Fragmente wurde das Primerpaar 408hin und 408her eingesetzt. Die Verzögerung wurde mit aus *C. albicans* gereinigtem Efg1 durchgeführt. Auch in diesem Fall war eine Protein-DNA-Komplexbildung zu beobachten (Spur 3), die durch Kontrollen mit spezifischem (Spur 4) bzw. unspezifischem (Spur 5) Kompetitor bestätigt werden kann. Eine „Superhift"-Analyse war jedoch nicht möglich, da das verwendete Anti-Efg1-Antiserum bereits ohne Zugabe von Protein eine Verzögerung verursachte (Spur 2). Die Negativkontrolle mit dem 313 bp-Fragment verlief wie erwartet, da keine Bindung von Efg1 festgestellt werden konnte (Spur 8). Es kann somit keine Aussage darüber getroffen werden, welche Funktion das ARE-Motiv hinsichtlich der Efg1-Regulation besitzt. Da jedoch in keinem der untersuchten DNA-Fragmente alle ARE oder anderen potentiellen regulatorischen Motive gleichzeitig deletiert wurden, ist zu vermuten, dass entweder mehrere Motive gemeinsam für eine regulatorische Funktion benötigt werden oder dass sich Motive hinsichtlich ihrer Funktion kompensieren können. Betrachtet man zudem die intergenische Region des *EFG1*-Promotors, dann können noch eine große Anzahl weiterer ARE oder ARE-ähnlicher Motive identifiziert werden, welche alle mögliche DNA-Bindemotive des Efg1 Proteins darstellen.

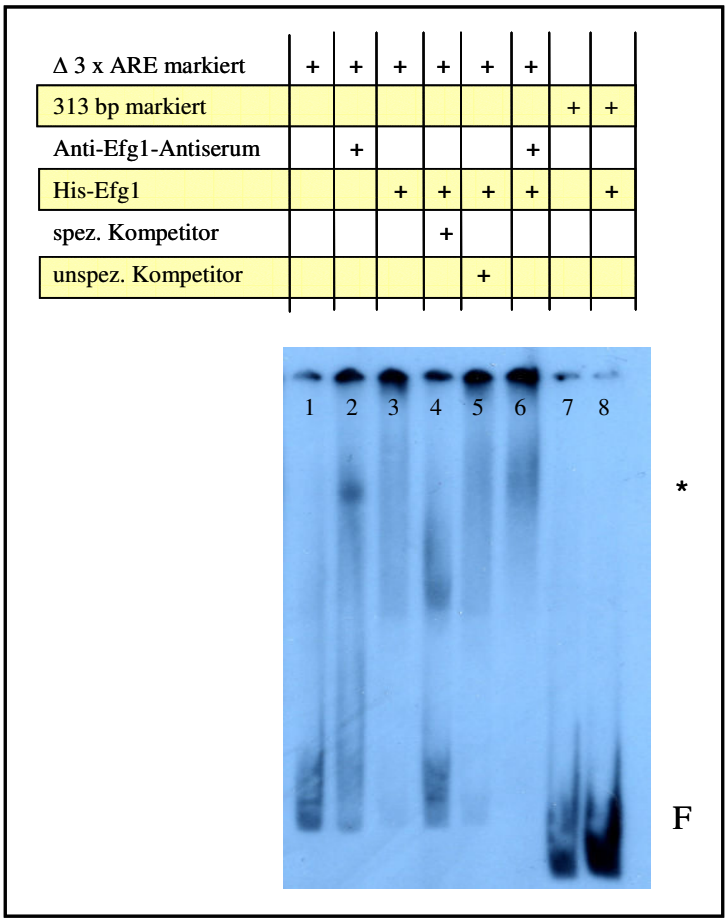


Abb. 3.35: Gelretardierung mit His-Efg1 (*C. albicans*) und dem Δ 3 x ARE DNA-Fragment. ^{32}P-markierte DNA wurde mit aufgereinigtem Protein in einem Bindungsassay auf ein 8 % PAA/TBE-Gel aufgetragen und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. S: „Supershift"; *: verzögerter Protein-DNA-Komplex; F: freie DNA. Spur 1 zeigt die freie DNA (Δ 3 x ARE) ohne Protein, Spur 2: die AK-Kontrolle mit 2 µl Anti-Efg1-Antiserum, Spur 3: ca. 2,5 µg His-Efg1, Spur 4: ca. 2,5 µg His-Efg1 mit spezifischem Kompetitor (100 x Menge an unmarkiertem DNA-Fragment), Spur 5: ca. 2,5 µg His-Efg1 mit unspezifischem Kompetitor (100 x Menge an 313 bp-Fragment), Spur 6: ca. 2,5 µg His-Efg1 mit 2 µl Anti-Efg1-Antiserum, Spur 7: zeigt die freie DNA (313 bp) ohne Protein, Spur 8: zeigt die Negativkontrolle (313 bp) mit ca. 2,5 µg His-Efg1.

4 Diskussion

C. albicans ist der bedeutendste Erreger humaner Pilzinfektionen (Hermann *et al.*, 2001). Als opportunistischer Erreger führt er bei gesunden Menschen mit intaktem Immunsystem zu keiner Symptombildung, da er durch das Immunsystem abgewehrt werden kann. Kommt es jedoch zu einer Abschwächung des Immunsystems, kann es zum Auftreten von lokalen Infektionen und systemischen Candidosen kommen, die oft tödlich verlaufen. Neben einer Reihe weiterer Virulenzeigenschaften wird die Pathogenität von *C. albicans* entscheidend durch die als Dimorphismus bezeichnete Eigenschaft bestimmt. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit in der morphologischen Wachstumsform einer kugeligen Hefe oder der einer filamentösen Hyphe zu wachsen (Odds, 1988). Die Morphogenese aber auch der Metabolismus werden dabei entscheidend durch den Transkriptionsfaktor Efg1 reguliert. Dieses zur Familie der APSES-Proteine zählende Protein besitzt eine 100 Aminosäuren-lange Region, die so genannte APSES-Domäne. Diese Domäne enthält ein zentrales basisches Helix-Loop-Helix Motiv (bHLH), welches für die Dimerisierung und DNA-Bindung von Bedeutung ist. Die genauen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Regulation durch Efg1 sind bisher nicht geklärt. Bislang konnten die drei Proteine Sin3, Czf1 und Flo8 als Interaktionspartner von Efg1 identifiziert werden (Brown *et al.*, 1999; Doedt *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006; Vinces *et al.*, 2006). Welches DNA-Bindemotiv als Efg1-Zielsequenz fungiert ist noch unklar, jedoch konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass *EFG1* autoreguliert wird und somit die Efg1-Zielsequenz im *EFG1*-Promotor zu suchen ist.

Ziel dieser Arbeit war es den Transkriptionsfaktor Efg1 mit einem Decahistidin-*tag* in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *C. albicans* zu überexprimieren und anschließend durch Metallaffinitätschromatographie zu isolieren. Dieses gereinigte Protein sollte anschließend für weitere biochemische Analysen genutzt werden. Da es sich bei Efg1 um ein bHLH Protein handelt, und von diesen Proteinen die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren bekannt ist, wurde durch Gelfiltrationschromatographie die molekulare Masse und somit eine mögliche Homodimerisierung von Efg1 untersucht. Zudem sollte ein spezifischer Anti-Efg1-Antikörper hergestellt werden und die Phosphorylierung von Efg1 sollte untersucht werden. Zur Klärung der Efg1-Zielsequenz wurde *in vivo* in *S. cerevisiae* das Bindungsverhalten von Efg1 an verschiedene *EFG1*-Promotorbereiche untersucht und durch *in vitro* Gelretardierungsversuche die Bindung von Efg1 an den eigenen Promotor nachgewiesen.

4.1 Expression des *EFG1*-Gens und Reinigung von Efg1

Für die Proteinreinigung von Efg1 wurde zunächst als Wirtsorganismus der Prokaryot *E. coli* ausgewählt. Bakterielle Expressionsysteme bieten dabei den Vorteil, dass sie leicht zu manipulieren und zu kultivieren sind. So können zeit- und kostengünstig hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein produziert werden. Mit Hilfe des pET-Systems ist es möglich, eine für ein Protein kodierende Sequenz unter die transkriptionelle Kontrolle des leistungsstarken *T7*-Promoters zu stellen, der nur von der T7-RNA-Polymerase abgelesen wird. Diese ist bei dem *E. coli* Stamm BL21 in das Genom integriert und steht unter der Kontrolle des Lac-Promotors. Durch die hohe Selektivität gegenüber dem *T7*-Promotor und die große Prozessivität der T7-RNA-Polymerase können mit diesem Expressionssystem Ausbeuten an rekombinantem Protein erreicht werden, die bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge ausmachen (Studier *et al*., 1990; Baneyx, 1999). Für die Expression von Efg1 in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde das Expressionsplasmid pET19-His-Efg1 verwendet. Da *C. albicans* über einen ungewöhnlichen Kodongebrauch verfügt, wobei das Basentriplett CUG in Serin übersetzt wird, anstatt wie üblicherweise in Leucin, wurde durch Mutagenese-PCR ein dem Kodongebrauch von *C. albicans* angepasstes *E. coli*-Expressionsplasmid konstruiert (pET19-His-Efg1Kodon). Die Identität des mit dieser Methode isolierten Efg1-Proteins wurde durch Massenspektrometrie verifiziert. Insgesamt betrug die erzielte Efg1-Proteinausbeute ca. 3-4 mg Efg1 pro Liter *E. coli*-Expressionskultur.

Für viele biochemische Anwendungen ist es erforderlich, dass das gereinigte Protein über einen längeren Zeitraum stabil gelagert werden kann. Die anfängliche Reinigung von Efg1 schien jedoch nicht die optimale Pufferzusammensetzung für eine längerfristige Lagerung des Proteins zu sein, da die Aufbewahrung bei unterschiedlichen Temperaturen zu einer Proteindegradierung und Aggregatbildung führte. Daher wurde die Proteinstabilität durch experimentelle Pufferoptimierung erhöht. Hierzu wurde eine Methode basierend auf einer analytischen Gelfiltrationschromatographie verwendet (Martinez *et al.*, 2008). Durch Vergleich der Chromatogramme konnte die Pufferzusammensetzung an das Efg1 angepasst werden. Als Resultat ergab sich nach Pufferoptimierung ein Puffer bestehend aus 20 mM CAPSO pH 9,5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Imidazol und 0,1 % Triton-X-100. Detergentien wie Triton-X-100 oder hohe Salzkonzentrationen haben dabei unter anderem den Effekt den Hintergrund zu minimieren, da unspezifische Bindungen auf Grund hydrophober oder ionischer Interaktionen verhindert werden. Auch werden Nukleinsäuren, die eventuell an ein zu reinigendes Protein binden, entfernt ohne die Proteinstruktur zu beeinflussen.

Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurde zudem eine Analyse des *EFG1*-Kodongebrauchs durchgeführt. Verschiedene Organismen haben eine unterschiedliche Präferenz für bestimmte Basentripletts des genetischen Codes, was sich in der Konzentration der entsprechenden tRNAs äußert. Durch selten verwendete Kodons bzw. ihre tRNAs kann es

zu ineffizienter Tanslation kommen und umgekehrt beschleunigen häufig verwendete Kodons die Translation. Die durchgeführte Analyse des *E. coli* Kodongebrauchs ergab, dass die Sequenz von *His-EFG1* viele Kodons enthält, die in *E. coli* nur selten vorkommen. Daher wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta 2 (DE3) pLysS getestet, welcher auf einem zusätzlichen Plasmid tRNAs für sieben selten in *E. coli* vorkommende Kodons besitzt. Durch Verwendung dieses *E. coli*-Stammes als Wirtsorganismus, konnte im Vergleich zum *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) eine fast 30 % höhere Proteinausbeute erreicht werden (4,15 mg/l). Zudem konnte mit diesem System die Induktion der Genexpression besser gesteuert werden, da durch das plasmidkodierte T7-Lysozym die basale Genexpression gehemmt wird.

Ein großer Nachteil bakterieller Expressionssysteme liegt jedoch in dem nicht Vorhandensein von posttranslationalen Modifikationen und in dem Fehlen von eukaryontischen Sekretionsmechanismen. Außerdem sind die produzierten Proteine häufig nicht aktiv oder liegen in Form von schwerlöslichen „inclusion bodies“ vor. Daher sollte alternativ Efg1 in dem Hefe-Expressionssystem *S. cerevisiae* exprimiert werden. Dieser Organismus ist bereits gut erforscht und dessen Kultivierung und Manipulation wurden bereits ausführlich beschrieben. Er verfügt über fast alle posttranslationalen Modifikationen, Proteinprozessierungen und Sekretionsmechanismen höherer eukaryontischer Zellen. Daher ist eine korrekte Faltung der Proteine, die Ausbildung von Disulfidbrücken oder die Glykosylierung und Phosphorylierung von Proteinen gegeben. Ein wesentlicher Nachteil von Hefe-Expressionssystemen besteht jedoch in der niedrigeren Proteinausbeute. Für die Expression von Efg1 in *S. cerevisiae* konnte erfolgreich das Plasmid p426-Gal1-His-Efg1 kloniert werden. Die Expression von Efg1 konnte durch Western-Blot-Analyse und die Funktionalität des gebildeten Efg1 durch einen Komplementationstest bestätigt werden. Somit steht ein funktionsfähiges Expressionssystem für die Produktion von Efg1 in *S. cerevisiae* zur Verfügung.

Für die Reinigung von Efg1 aus *C. albicans* wurde das Plasmid pBI-1-His-Efg1 verwendet. Bei dem verwendeten Plasmid steht die Expression des Zielgens unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors, welcher durch Anwesenheit von Glukose reprimiert wird. Efg1 konnte erfolgreich überexprimiert und anschließend durch Metallaffinitätschromatographie gereinigt werden. Da noch erhebliche Nebenprodukte vorhanden waren, könnte eine Verbesserung der Reinigung eventuell durch eine Änderung der Wasch- und Elutionsbedingungen während der Chromatographie erreicht werden und das Kulturvolumen vergrößert werden.

Die Voraussetzung für die Analyse der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist dessen Kristallisation. Hierzu wird eine hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem hohen Reinheitsgrad benötigt. Durch anschließende Zugabe von verschiedenen Pufferlösungen wird die Löslichkeit des Proteins herabgesetzt und es kann zum spontanen Auftreten von Kristallisationskeimen kommen. Zwar konnte Efg1 bereits ohne größere Verunreinigungen aus *E. coli* isoliert werden, jedoch sollte für eine mögliche Kristallisation eine weitere Aufreinigung erfolgen. Mit einer Gelfiltrationschromatographie könnte Efg1 nach erfolgter Affinitätschromatographie von eventuell vorhandenen Verunreinigungen befreit werden. Eine

weitere Reinigungsmöglichkeit bestände in der Tap-*tag*-Epitopmarkierung von Efg1. Durch zwei Chromatographieschritte über zwei unterschiedliche Affinitätssäulen könnte dann eine effizientere Reinigung des Proteins erreicht werden.

Zwar ist die Epitopmakierung eines Proteins für dessen Reinigung durch Metallaffinitätschromatographie erforderlich, jedoch ist für bestimmte Anwendungen eine nachträgliche Abspaltung des *tags* erforderlich. So konnte z. B. in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die N-terminale Epitopmarkierung von Efg1 dessen Funktion unter hypoxischen Bedingungen beeinflusst. Das Vorhandensein eines *tags* kann sich aber auch negativ bei einer Kristallisation auswirken. Daher beinhaltet das hier verwendete Fusionsprotein die Erkennungssequenz für eine Enterokinase, so dass die Möglichkeit einer spezifischen und effizienten Abspaltung des His-*tags* gegeben ist.

4.2 Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Hinblick auf eine Verbesserung der Detektion einen Antikörper zu generieren, der spezifisch und mit einer hohen Affinität Efg1 bindet. Die durch die Firma Eurogentec durchgeführte Immunisierung wurde in Kaninchen vorgenommen. Zunächst wurde hierfür das Efg1-Antigen heterolog in *E. coli* produziert und anschließend durch Metallaffinitätschromatographie gereinigt. Nach Test der Preimmunseren von fünf Kaninchen, wurden pro Boost 100 µg des His-getaggten Efg1 in mehreren Immunisierungsschritten zur Herstellung des polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums in zwei Kaninchen injiziert. Bei einem der immunisierten Kaninchen wurde tatsächlich ein Anti-Efg1-Antikörper gebildet. Durch einen ELISA-Test konnten hohe Antikörper-Titer gegen Efg1 nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte außerdem die untere Nachweisgrenze des Antiserums bei ca. 150 ng aus *E. coli* gereinigtem Efg1 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Spezifität des Anti-Efg1-Antiserums wurde zunächst durch Untersuchung der Detektionsmöglichkeit von Efg1, das in unterschiedlichen Organismen produziert wurde, vorgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit dem Antiserum ein Nachweis von gereinigtem Efg1 aus dem Prokaryoten *E. coli*, sowie der Nachweis von Efg1 aus Rohextrakten und angereicherten Fraktionen der Eukaryonten *S. cerevisiae* und *C. albicans* möglich war. Für die Detektion spielte es dabei keine Rolle, ob Efg1 in seiner wildtypischen Form vorlag oder in einer epitopmarkierten Variante. Sowohl die His- als auch die HA-getaggte Version von Efg1 konnten nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte durch Detektion von Efg1-Deletionsvarianten (Noffz *et al*., 2008) überprüft werden, dass es sich bei dem generierten Anti-Efg1-Antiserum um ein polyklonales Antiserum handelt, welches nicht gegen spezielle Epitope von Efg1 gerichtet ist, sondern Immunglobuline enthält, die sämtliche Epitope des Efg1-Antigens erkennen. Dass Verhalten

des Antiserums wird in zukünftigen Versuchen mit Subfragmenten von Efg1 von großem Nutzen sein. Das Anti-Efg1-Antiserum ist auch für die Immunpräzipitation von Efg1 aus Rohextrakten geeignet und Vorversuche zeigten die Anwendbarkeit in Chromatinimmunpräzipitations-Experimenten (ChIP). Außerdem wurde versucht das Antiserum zur zellulären Lokalisation von Efg1 über Immunfluoreszenz einzusetzen. Leider konnte auf Grund hoher Hintergrundaktivität jedoch kein spezifisches Efg1-Signal ausgemacht werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass es sich bei dem Anti-Efg1-Antiserum um ein nach der Immunisierung aus dem Blut aufbereitetes Blutserum handelt, welches neben den spezifischen Antikörpern noch Antikörper gegen Verunreinigungen von Efg1 und weitere Proteine enthält. Durch Affinitätschromatographien, an immobilisiertes Efg1 kann möglicherweise noch eine höhere Spezifität des Antikörpers erreicht werden.

4.3 Dimerisierung von Efg1

Die Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren ist charakterisiert durch die bHLH-Domäne, einen Aminosäuresequenzbereich mit einer hohen Homologie. Diese Domäne besteht aus ca. 60 Aminosäuren die zwei unterschiedliche Regionen mit unterschiedlicher Funktion aufweist. Die basische Region am N-terminalen Ende der Domäne ist an der DNA Bindung beteiligt, sie besteht aus ca. 15 Aminosäuren und weist eine große Anzahl konservierter basischer Aminosäurereste auf. Die Helix-Loop-Helix-Region bildet das C-terminale Ende der Domäne und stellt eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar, die für die Dimerisierung der bHLH-Proteine entscheidend ist (Murre *et al.*, 1989; Ferré-D'Amaré *et al.*, 1994). Sie besteht aus hauptsächlich hydrophoben Resten, die zwei amphiphatische Helices bilden, die durch eine Aminosäure-Schleife von variabler Länge getrennt werden (Murre *et al.*, 1989).

Durch Ausbildung unterschiedlicher Homo- oder Heterodimere entsteht eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten hinsichtlich der DNA-Bindespezifität und auch der regulatorischen Funktion. So können mit Einsatz weniger regulatorischer Proteine die komplexen zeitlichen und räumlichen Vorgänge der Trankriptionskontrolle innerhalb der Zelle reguliert werden. Dabei beschränken manche Proteine ihre Fähigkeit auf die Ausbildung von Homodimeren, andere bilden wiederum mit einer großen Anzahl verschiedener Proteine die unterschiedlichsten Heterodimere aus. So konnte für das bHLH-Familienmitglied E12 gezeigt werden, dass dieses ein gewebespezifisches Regulierungspotential besitzt, indem es mit gewebespezifischen bHLH-Proteinen unterschiedliche Heterodimere ausbildet (Quong *et al.*, 1993).

Durch Bindung eines Dimerisierungspartners kann auch die Art der regulatorischen Funktion variiert werden. Eukaryontische Transkriptionsfaktoren zeichnen sich zumeist durch unterschiedliche funktionelle Bereiche aus. Neben einer DNA-Bindedomäne enthalten sie

häufig noch eine Aktivierungs- bzw. Repressionsdomäne, durch welche die transkriptionelle Regulation vermittelt wird. Dabei ist das Vorhandensein einer eigenen Aktivierungsdomäne nicht zwingend erforderlich, sondern kann durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren moduliert werden. Als Beispiel kann hierbei die Dimerisierung der Säugerproteine Max und Myc genannt werden. Der Transkriptionsfaktor Max verfügt über keine eigene Aktivierungsdomäne, so dass Max/Max-Homodimere eine Repression der Transkription bewirken (Abb. 4.1) (Ayer und Eisenmann, 1993). Durch Erhöhung der intrazellulären Myc-Konzentration wird ein Max Protein kompetetiv aus dem Komplex verdrängt und es kommt zur Ausbildung von Max/Myc-Heterodimeren (Blackwood

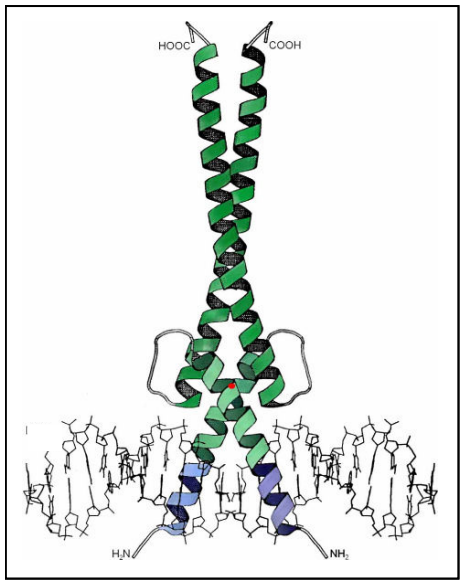


Abb. 4.1: Schematische Darstellung eines Max/Max-Homodimers gebunden an ein DNA-Fragment (modifiziert nach Atchley, *et al.*, 2000). Die basischen Bereiche der beiden bHLH-Monomere sind blau dargestellt, die Helices in grün.

und Eisenmann, 1991). Dieses Heterodimer bindet mit einer höheren Affinität an die gleiche DNA-Bindesequenz wie das Max/Max-Homodimer, bewirkt aber eine Transkriptionsaktivierung. Andererseits kann wiederum die Dimerisierung von Myc mit anderen Proteinen auch eine Repression von Genen bewirken (Shristava *et al*., 1996; Peukert *et al*, 1997). Die Repression wird dabei durch die Bindung des Dimerisierungspartners an die Aktivierungsdomäne von Myc vermittelt, wodurch es zu einer Maskierung der Aktivierungsdomäne kommt (Bouchard *et al*., 1998). Durch Proteininteraktion mit unterschiedlichen Dimerisierungspartnern kann so einem Protein die bivalente Fähigkeit als Aktivator oder auch als Repressor der Tanskription zu fungieren, verliehen werden.

Efg1 gehört wegen der hoch konservierten 100-Aminosäuren-Region zur Familie der APSES-Proteine. Durch ein in der APSES-Domäne enthaltenes zentrales basisches Helix-Loop-Helix Motiv (bHLH), wird Efg1 auch zur strukturellen Klasse der bHLH-Proteine gezählt. Alle Mitglieder der APSES-Proteinfamilie sind Regulatoren von morphogenetischen Prozessen in Ascomyceten. In *S. cerevisiae* konnten bisher die beiden APSES-

Familienmitglieder Phd1 und Sok2 charakterisiert werden, die in einer antagonistischen Wirkungsweise die Pseudohyphenbildung beeinflussen. Sowohl eine *SOK2*-Deletion wie auch eine Überexpression von *PHD1* führen zu verstärkter Ausbildung von Pseudohyphen (Ward *et al*., 1995; Gimeno und Fink, 1994). Mit Efh1 konnte später auch ein zweites APSES-Mitglied in *C. albicans* identifiziert werden (Doedt *et al*., 2004). In diesem Fall zeigten Setiadi *et al*., dass Efh1 synergistisch mit Efg1 bei der Repression der Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen wirkt (Setiadi *et al*., 2006). Interessant ist, dass durch Zwei-Hybrid-Analysen bereits die Homodimerbildung von Efh1 nachgewiesen werden konnte, während eine Efg1-Dimerisierung dadurch nicht gezeigt wurde (Bockmühl, 2001; Doedt *et al*., 2004). In dieser Arbeit konnte jetzt auch die Homodimerisierung von Efg1 nachgewiesen werden.

Hierzu wurde zur Ermittlung der molekularen Masse von nativem Efg1, eine Gelfiltrationschromatographie mit gereinigtem Efg1 aus *E. coli* und aus *C. albicans* durchgeführt. An Hand einer zuvor erstellten Eichgerade konnten anschließend während der Chromatographie gesammelte Fraktionen auf ihre molekulare Masse untersucht werden. In den einzelnen Elutionsfraktionen konnte dabei lediglich bei der Laufhöhe von ca. 83 kDa ein Signal in einer Western-Blot-Analyse beobachtet werden, was der Laufhöhe des Efg1-Monomers entspricht. Bei manchen Versuchen konnte außerdem noch bei dem Ausschlussvolumen Efg1 nachgewiesen werden, das vermutlich in aggregierter Form vorliegt.

Die molekulare Masse von nativem Efg1 konnte auf 168 bis 201 kDa festgelegt werden. Dieser Wert entspricht am ehesten einem Efg1-Dimer. Da die berechnete molekulare Masse von Efg1 aber nur ca. 62 kDa beträgt, wäre auch die Ausbildung eines Efg1-Trimers möglich oder die Ausbildung eines Heterodimers mit einem unbekannten Protein. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Vernetzungsexperiment mit einem nicht reversiblen „Crosslinker“ konnte ausgehend von einer Laufhöhe von 83 kDa, treppenartig eine Erhöhung der molekularen Masse von Efg1 beobachtet werden, die bei 170 kDa das stärkste Signal ergab. Wie das Ergebnis der Gelfiltrationschromatographie kann auch dieses Signal einem Efg1-Dimer zugeordnet werden.

Für Efg1 kann je nach zellulärem Vorgang eine aktivierende bzw. reprimierende trankriptionelle Regulation beobachtet werden. So äußert sich z. B. die reprimierende Funktion in der negativen Autoregulation des *EFG1*-Gens oder in der Unterdrückung des filamentösen Wachstums unter hypoxischen Bedingungen. Andererseits wirkt unter normoxischen Bedingungen Efg1 als Aktivator der Hyphenbildung und Aktivator des fermentativen Metabolismus, während der oxidative Metabolismus reprimiert wird. Das Regulierungspotential von Efg1 könnte folglich auf der Ausbildung unterschiedlicher Homo- oder Heterodimere beruhen. Für Efg1 wird das Fehlen einer eigenen Aktivierungsdomäne diskutiert, so dass die reprimierende Fähigkeit, wie bei dem Max/Max-Homodimer, durch eine Homodimerisierung von Efg1 bewirkt werden könnte. Ein potentieller Interaktionspartner könnte auch das zweite in *C. albicans* entdeckte APSES-Protein Efh1 darstellen. Jedoch fehlt bisher der Beweis einer Heterodimerisierung dieser beiden Proteine.

4.4 Efg1 ist mehrfach phosphoryliert

Die meisten Proteine einer Zelle werden zahlreichen posttranslationalen Modifikationen unterzogen, welche die Struktur und Funktion eines Proteins entscheidend beeinflussen können. Zu den häufigsten Modifikationen zählen die Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung oder eine Ubiquitinylierung. Da Efg1 in SDS-PAGE Analysen nicht bei seiner errechneten Laufhöhe von ca. 62 kDa zu detektieren ist, sondern bei einer Laufhöhe von ca. 83 kDa, werden für Efg1 ebenfalls posttranslationale Modifikationen vermutet, obwohl auch die spezifische Aminosäurenanordnung eines Proteins ein abnormales Migrationsverhalten in der SDS-PAGE bewirken kann. Efg1 wird als Dreifachbande in einer Laufhöhe von insgesamt 75-88 kDa durch SDS-PAGE nachgewiesen (Bockmühl und Ernst, 2001). Durch Behandlung von *C. albicans* Rohextrakten mit alkalischer Phosphatase konnte bereits gezeigt werden, dass die höhermolekularen beiden Banden auf eine posttranslationale Phosphorylierung zurückgehen (Bockmühl, 2001). So war nach einer Phosphatase-Behandlung lediglich die untere Efg1-Bande bei einer Laufhöhe von 75 kDa nachweisbar, was in dieser Arbeit bestätigt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass Efg1 in einer unphosphorylierten Grundform vorliegt und zwei weitere phosphorylierte Varianten des Proteins in der Zelle vorkommen. Interessanterweise kann auch die Hefe *S. cerevisiae* das heterologe Protein Efg1 phosphorylieren, da ein ähnliches Bandenmuster und eine Phosphatase-Sensitivität von Efg1 festzustellen war. Bei dem aus *E. coli* gewonnenen Efg1 konnte hingegen kein Effekt zwischen Phosphatase-behandelter und unbehandelter Probe festgestellt werden und das Protein migrierte als 75 kDa Protein.

Eine Modifizierung von Efg1 in *S. cerevisiae* durch Ubiquitin bzw. durch die Ubiquitin-ähnlichen Proteine SUMO und RUB konnte bereits ausgeschlossen werden (Doedt, 2003). Durch Immunoblot-Analysen mit Antikörpern gegen Phospho-Threonin konnte jedoch gezeigt werden, dass die oberste der drei detektierbaren Efg1-Banden auf einer Phosphorylierung an einem Threonin-Rest beruht (Bockmühl, 2001), während Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper und Anti-Acetyl-Lysin-Antikörper keine Modifikationen zeigten. Auch konnte mit Hilfe eines *O*-GlcNAc-Antikörpers ausgeschlossen werden, dass Efg1 *O*-glykosyliert wird (Sonneborn, 1999; Bockmühl, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch einen Anti-Phospho-Serin-Antikörper erste Hinweise darauf erhalten, dass die oberste detektierbare Efg1-Bande ebenfalls einer Serin-Phosphorylierung unterliegt (Daten nicht gezeigt). Somit scheint es sich bei Efg1 um ein mehrfach phosphoryliertes Protein zu handeln.

Durch Dephosphorylierung von Efg1-Deletionsvarianten sollte untersucht werden, welche Bereiche von Efg1 phosphoryliert sind. Dabei stellte sich heraus, dass überwiegend die Regionen der Deletionen D4 und D5 phosphoryliert zu sein scheinen. D4 umspannt dabei den Bereich der APSES-Domäne, inklusive der darin enthaltenen bHLH-Domäne und D5 die Alanin- und Prolin-reiche Domäne. Eventuell könnte aber auch eine Deletion dieser Regionen die Konformation von Efg1 so stark verändern, dass eine Phosphorylierung des Proteins nicht

mehr möglich ist. Die Phosphorylierung der bHLH-Domäne könnte die Ausbildung unterschiedlicher Homo- oder Heterodimere regulieren bzw. die DNA-Bindefähigkeit von Efg1 beeinflussen.

In der Sequenz von Efg1 können Konsensussequenzen für unterschiedliche Proteinkinasen gefunden werden. Die Relevanz einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase A an dem T206 konnte durch Aminosäureaustausche bestätigt werden (Bockmühl und Ernst, 2001). Die Substitution durch einen Glutamatrest führte zu einer hyperfilamentösen Efg1-Variante und eine Alanin-Substitution bewirkte hingegen eine reduzierte morphogenetische Aktivität. Ein direkter Nachweis der Proteininteraktion zwischen Efg1 und der Proteinkinase A konnte allerdings noch nicht erbracht werden.

Auf Grundlage dieser Versuche wurde in dieser Arbeit der Phosphorylierungsstatus von Efg1 in *tpk1*- bzw. *tpk2*-Deletionsmutanten untersucht. Da bekannt ist, dass der *EFG1*-Transkriptspiegel nach Hypheninduktion kurzzeitig absinkt und dabei eine Aktivierung durch eine Phosphorylierung über die Proteinkinase A vermutet wird, wurde der zeitliche Verlauf der Efg1-Phosphorylierung nach Hypheninduktion betrachtet. In einem Wildtypstamm konnte über den zeitlichen Verlauf der Hypheninduktion ein Anstieg der Intensität der mittleren Efg1-Bande und eine Abschwächung der obersten Efg1-Bande beobachtet werden. Dieses Ergebnis spricht für die Regulation von Efg1 über einen veränderten Phosphorylierungsstatus. Außerdem scheint Efg1 in der Zelle mit einer Grundphosphorylierung versehen zu sein, da die mittlere Efg1-Bande in allen Versuchen die stärkste Intensität aufwies. Bei den Versuchen in den *tpk*-Deletionsmutanten konnte kein Unterschied zu dem Phosphorylierungsmuster des Wildtypstamms beobachtet werden, wobei es allerdings möglich ist, dass die beiden Tpk-Isoformen sich in ihrer Funktion kompensieren könnten.

An Position 208-211 von Efg1 befindet sich die Zielsequenz für die Caseinkinase II. Aminosäureaustausche dieser Stelle zeigten jedoch keinen Einfluss auf die Hyphenbildung (Bockmühl, 2001). In dieser Arbeit wurde des Weiteren die an Position 179 befindliche Zielsequenz für die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28-Hgc1 untersucht. Es konnte allerdings kein Unterschied im Phosphorylierungsstatus bzw. in der DNA-Bindefähigkeit des modifizierten Efg1-Proteins festgestellt werden. Wang *et al*. konnten hingegen zeigen, dass Efg1 an Position 179 von Efg1 durch die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28-Hgc1 phosphoryliert wird (Wang *et al*., 2009). Diese Phosphorylierung bewirkt in Folge eine Reprimierung von Ace2 regulierten Genen in der G1-Phase. Der Transkriptionsfaktor Ace2 befindet sich im Kern der Tochterzelle in der späten M/G1 Phase und kontrolliert die Expression von Tochterzell-spezifischen Genen wie Chitinasen oder Glukanasen, welche wiederum eine Degradierung des Septums bewirken und so zu einer Zelltrennung führen. Die Repression von Ace2 durch Efg1 unterdrückt somit die Trennung von Zellen an den Septen und erlaubt kontinuierliches filamentöses Wachstum.

Daneben spielt die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28-Hgc1auch noch eine Rolle in der Aufrechterhalung des filamentösen Wachstums. Vermittelt wird diese Funktion hierbei durch die inhibierende Phosphorylierung von Rga2. Dabei handelt es sich um einem GTPase (GAP,

GTPase-activating protein) von Cdc42 die dessen GTP-Hydrolyse beeinflusst und und so zu einer Deaktivierung führt. Nur wenn Cdc42 in seiner GTP-gebundenen Form vorliegt, was über GEFs (guanine-nucleotide exchange factors) wie z. B. Cdc24 vermittelt wird, kann es seine Funktion hinsichtlich der Regulation der Zellpolarität ausführen. Dazu gehören z. B. die Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts oder auch der Vesikeltransport. Durch Phosphorylierung von Rga2 wird dieses somit deaktiviert und ein kontinuierlich hoher Spiegel von aktivem CDC42-GTP in der Spitze von hyphalen Zellen wird gewährleistet.

Aber auch die Initiierung der Hyphenmorphogenese wird durch Cdc28-Hgc1 reguliert. Durch Phosphorylierung des Septins Cdc11 durch Cdc28-Ccn1 an dessen Ser395 wird dieses aktiviert und seine Lokalisierung an der Position der Keimschlauchbildung bewirkt. Für die Aufrechterhaltung dieses Signals ist allerdings die weitere Phosphorylierung des Serin-Restes durch Cdc28-Hgc1 erforderlich.

Posttranslationale Modifikationen, einschließlich Phosphorylierung können die Aktivität und die Funktion von Proteinen stark beeinflussen. Eine Phosphorylierung des Max/Max-Homodimers durch die Caseinkinase II erhöht z. B. dessen DNA-Bindefähigkeit (Bergstrom und Tapscott, 2001). Andererseits verliert der Transkriptionsfaktor MyoD nach einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase C seine Fähigkeit an die DNA zu binden (Johnson *et al.*, 1996). Die Acetylierung von Proteinen stellt ebenso eine wichtige posttranslationale Modifikationsform von Transkriptionsfaktoren dar. So ist z. B. für den Transkriptionsfaktor MyoD, welcher für die transkriptionelle Aktivierung die Histon-Acetyltransferase p300 rekrutiert, bereits eine Acetylierung nachgewiesen worden. Da von Efg1 angenommen wird, dass dieses Protein die Expression seines eigenen Gens durch Rekrutierung eines Histon-Deacetylase-Komplexes reguliert, wäre es außerdem interessant die mögliche Deacetylierung von Efg1 zu untersuchen.

Alles in allem zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass Efg1 neben einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase A noch vermutlich weitere Phosphorylierungen von anderen Proteinkinasen besitzt. Dadurch entstehende unterschiedliche Phosphorylierungsstufen von Efg1 könnten die Efg1-abhängige Regulation vermitteln. Die Hauptphosphorylierung von Efg1 erfolgt deswegen über noch nicht weiter definierte Kinasen.

4.5 Einfluss des singulären Cys218-Restes und der Epitopmarkierung auf die Funktion von Efg1

Wichtige Ziele in der Erforschung der molekularen Regulation durch den Transkriptionsfaktor Efg1 sind unter anderem die Identifizierung von Interaktionspartnern oder auch die Identifizierung des von Efg1 gebundenen DNA-Sequenzmotivs. Hinsichtlich der Interaktionspartner konnten bereits einige Erkenntnisse gewonnen werden. So konnte eine Interaktion zwischen Efg1 und Sin3, Czf1 und Flo8 nachgewiesen werden (Brown *et al.*,

1999; Doedt *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006; Vinces *et al.*, 2006). Mit Hilfe der FRET-Technik könnten diese Protein-Protein-Interaktionen überprüft, sowie neue potentielle Efg1-Interaktionspartner entdeckt werden. Auch könnte die Fähigkeit von Efg1, an unterschiedliche DNA-Bindemotive, wie ARE-Motive, MCB-Elemente oder E-Boxen zu binden, untersucht werden. Um die Markierung an einem Cystein von Efg1 zu simulieren, bzw. um den Effekt dieser Punktmutation zu untersuchen, wurde deshalb das entsprechende Cystein durch Mutagenese-PCR gegen ein Alanin ausgetauscht. Anschließend wurden verschiedene Komplementationstests durchgeführt.

Da *efg1*-Mutanten unter nahezu allen normoxischen Induktionsbedingungen ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung verlieren, wurde dieser Phänotyp zur Überprüfung der Proteinfunktion näher untersucht (Lo *et al.*, 1997). Es wurde die Hypheninduktion sowohl in flüsigem Medium, als auch auf festen Medien bei der induzierenden Temperatur von 37 °C untersucht. In allen Fällen konnte eine Komplementation der *efg1*-Mutante durch HA-Efg1C218A festgestellt werden, d. h. es konnte wie beim Wildtyp (CAI4) eine Filamentbildung beobachtet werden. Durch ein Auszählen der gebildeten Hyphen in flüssigem Induktionsmedium konnte auch eine quantitative Aussage über die Hyphenbildung der einzelnen Stämme gemacht werden. Dabei stellte sich heraus, dass keiner der untersuchten Stämme einen Defekt in der quantitativen Ausbildung der Hyphen oder im zeitlichen Beginn der Hyphenbildung zeigte.

Unter hypoxischen Wachstumsbedingungen wirkt Efg1 als Repressor der Hyphenbildung, während es unter normoxischen Bedingungen einen aktivierenden Effekt auf das filamentöse Wachstum ausübt. Aber auch andere Phänotypen wie die Chlamydosporenbildung oder der Wechsel von der *white*- in die *opaque*-Form zählen zu den hypoxischen Veränderungen (Sonneborn *et al.*, 1999; Miller und Johnson, 2002). Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor Efg1 an der Regulation von ca. 50 % aller hypoxisch regulierten Gene beteiligt ist (Setiadi *et al.*, 2006; Ernst und Tielker, 2009).

Zur Analyse der Funktion von Efg1 unter hypoxischen Wachstumsbedingungen wurde unter anderem der Phänotyp der Chlamydosporenbildung zur Komplementation herangezogen. Auch hier komplementierte der Stamm mit dem C218A-Austausch den *efg1*-Deletionsstamm. Wie auch bei dem Wildtypstamm CAI4 und dem Ausgangsstamm HLCEEFG1 konnte an der Spitze von hyphalen Zellen das Vorhandensein von Chlamydosporen beobachtet werden.

Daneben wurde auch die Hyphenbildung unter hypoxischen Wachstumsbedingungen untersucht. So wächst unter diesen Bedingungen ein Wildtypstamm in der Wachstumsform einer Hefe und die *efg1*-Mutante ist auf Grund des Fehlens von Efg1 in der Lage filamentös zu wachsen (Sonneborn *et al.*, 1999b; Brown *et al.*, 1999). Dieser stark filamentöse Phänotyp konnte nun neben der *efg1*-Mutante (HLC52) unerwarteterweise auch in dem Ausgangsstamm (HLCEEFG1) mit der HA-getaggten Efg1-Variante und in dem Stamm mit dem entsprechenden C218A-Aminosäureaustausch (HLC67[pDK9]) beobachtet werden. Eine

heterozygote Kontrolle mit einer nicht epitopmarkierten Efg1-Variante (BCA0901), zeigte dagegen ein hypoxisches Hefe-Wachstum. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die N-terminale Epitopmarkierung von Efg1 seine Funktionalität, genauer gesagt seine hypoxische Repressorfunktion blockiert.

Die Repressoraktivität von Efg1 scheint daher im N-terminalen Bereich von Efg1 lokalisiert zu sein. In Struktur-Funktionsanalysen von Efg1 konnte gezeigt werden, dass bei Verlust der N-terminalen Glutamin-reichen Domäne und des C-terminalen Bereichs der APSES-Domäne ein starker Defekt der Repressor-Aktivität in einem für *C. albicans* optimierten Ein-Hybrid System zu verzeichnen ist (Noffz *et al*., 2008). Vermutlich kommt es durch diese N-terminale Markierung zu einer Konformationsänderung oder die Interaktion mit einer spezifischen DNA-Sequenz oder einem Interaktionspartner wird verhindert, so dass Efg1 nicht mehr seine reprimierende Funktion ausüben kann. Für weitere Analysen von Efg1 unter hypoxischen Bedingungen ist daher die Verwendung von nicht Epitop-markiertem Efg1 zu empfehlen. ChIP-Experimente könnten jetzt mit dem nativen Efg1 durchgeführt werden, da die Immunpräzipitation von Efg1 mit dem in dieser Arbeit generierten Anti-Efg1-Antiserum möglich ist.

Es wurde ebenfalls der Phosphorylierungsstatus von Efg1 unter hypoxischen Wachstumsbedingungen untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied hinsichtlich der Phosphorylierung festgestellt werden. Wie auch unter normoxischen Bedingungen war Efg1 als Dreifachbande zu detektieren, wobei die oberste Efg1-Bande nur sehr schwach ausgeprägt war.

Unter hypoxischen Wachstumsbedingungen kommt es unter anderem zu oxidativem Stress. Dieser entsteht während der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung, wobei die unvollständige Reduktion des Sauerstoffs die Ausbildung von hoch reaktiven Produkten, den so genannten ROS (reactive oxygen species) fördert. Der Oxidierung von Molekülen durch diese freien Radikale wirkt die Zelle z. B. durch Antioxidantien oder enzymatisch durch Katalasen und Superoxiddismutasen entgegen. So führt in *C. albicans* die aufgrund von hypoxischen Bedingungen gestörte Funktion der Mitochondrien zu einer positiven Regulation der Katalase Cta1. Dadurch werden vermutlich die entstehenden freien Radikale neutralisiert. Neben diesen schädigenden Einflüssen der Radikale, können diese allerdings auch als Signalmoleküle fungieren und zur Regulation der Transkription eingesetzt werden. So wird vermutet, dass ROS wichtige Faktoren der Zelle zur Anpassung an hypoxische Wachstumsbedingungen darstellen (Aguirre *et al*., 2005; Hervouet *et al*., 2008).

Aus *S. cerevisiae* ist der Transkriptionsfaktor Yap1 bekannt, der als Antwort auf oxidativen Stress die Transkription von Antioxidantien aktiviert. Die transkriptionelle Aktivität wird dabei durch dessen zelluläre Lokalisation bestimmt. Er besitzt an seinem N-Terminus ein NLS und am C-Terminus ein NES. Unter normalen Bedingungen wird Yap1 durch das Exportin Crm1 aus dem Kern transportiert. Kommt es jedoch zu oxidativem Stress der mit der Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) einhergeht, bewirkt dies eine Ausbildung von Disulfidbrücken in dem Yap1-Protein. Diese Konformationsänderung erlaubt die

Ansammlung von Yap1 im Kern und führt so zur Expression der Gene der Antioxidantien als Antwort auf den oxidativen Stress (Kuge *et al*., 2001). Die unter hypoxischen Wachstumsbedingungen von Efg1 vermittelte Regulation könnte somit eventuell ebenfalls durch dessen zelluläre Lokalisation bestimmt werden. Hierfür könnte das einzige an Position 218 gelegene Cystein verantwortlich sein. Efg1 könnte als O_2-Sensor fungieren, indem es ebenfalls Disulfidbrücken mit z. B. einem weiteren Efg1-Protein oder einem anderen Interaktionspartner ausbildet. Neben der Regulation durch eine Phosphorylierung oder der Dimerisierung könnte die Ausbildung von Disulfidbrücken und eine eventuell damit verbundene zelluläre Lokalisierung ein weiteres mögliches Modell der durch Efg1-vermittelten Regulation darstellen.

4.6 Regulation von Efg1 über Bindung des ARE-Motivs

Efg1 reguliert wie auch der Transkriptionsfaktor cMyc die Expression seines eigenen Gens durch negative Autoregulation. Durch Northernanalysen und durch Real time-PCR kann kurz nach Hypheninduktion ein Absinken des *EFG1*-Transkripts beobachtet werden (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al*., 2003; Lassak, pers. Mitteilung). Dieser Vorgang ist entscheidend für die Ausbildung eines echten hyphalen Wachstums, da ansonsten anstelle von echten Hyphen Pseudohyphen gebildet werden (Tebarth *et al*., 2003). Vermutlich verläuft die Regulation hierbei über Chromatin-Remodeling, da Efg1 nach Bindung des eigenen Promotors den Rpd3/Sin3 Histon-Deacetylase-Komplex rekrutiert. Durch Zwei-Hybrid-Analysen konnte bereits eine Interaktion von Sin3 und Efg1 festgestellt werden und durch ChIP-Experimente konnte nicht nur die Bindung von Efg1, sondern auch eine Bindung von Sin3 an den *EFG1*-Promotor gezeigt werden. Das Ausbleiben der negativen Autoregulation in einer *sin3*-Deletionsmutante führt wie erwartet zur Pseudohyphenbildung (Doedt, 2003; Tebarth *et al.*, 2003).

Das transkriptionell aktive Chromatin wird als Euchromatin und die inaktive Variante als Heterochromatin bezeichnet. Ein Wechsel zwischen diesen beiden Formen wird unter anderem durch kovalente Histonmodifikationen ausgelöst. Histonmodifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Methylierung oder Sumolyierung werden an den N-terminalen Enden der Histone vorgenommen und können sich aktivierend oder auch reprimierend auswirken (Li *et al*., 2007). Die Acetylierung von Histonen gilt generell als Aktivierungssignal. Durch Acetylierung der Histone verlieren diese ihre Affinität zur DNA, so dass es zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur kommt. Dies erlaubt im weiteren Verlauf eine Anlagerung der Transkriptionsmaschinerie und folglich einen Transkriptionsstart. In Hefen können zwei Hauptgruppen von Histon-Acetylierungs-Komplexen unterschieden werden. Bei einem bekannten Mitglied der Gcn5-Komplexe handelt es sich um den so genannten SAGA-Komplex. Der NuA4-Komplex hingegen ist ein

Mitglied der Esa1, Sas2, Sas3-Komplexe. Eine Verdichtung des Chromatins und somit eine Reprimierung der Genexpression wird wiederum über Deacetylierung der Histone durch Histon-Deacetylase-Komplexe verursacht. Dabei unterscheidet man zwischen Zink-abhängigen Deacetylasen und NAD^+-abhängigen Deacetylasen. Eine Interaktion von Efg1 mit einem Histon-Acetylase-Komplex konnte bereits nachgewiesen werden. Lu *et al* konnten zeigen, dass die Rekrutierung des NuA4 Komplexes durch Efg1 an die Promotoren von Hyphen-spezifischen Genen notwendig ist für eine H4-Acetylierung und auch die Bindung des Swi/Snf-Komplexes und folglich zur transkriptionellen Aktivierung (Lu *et al*., 2008). Umgekehrt wird der Rpd3/Sin3 Histon-Deacetylase-Komplex zur Reprimierung der eigenen Genexpression eingesetzt.

Welche Zielsequenz dazu im eigenen Promotor von Efg1 gebunden wird, konnte bisher nicht exakt geklärt werden. In früheren Studien wurde gezeigt, dass ein 23 bp-großer Bereich direkt vor der TATA-Box essentiell für die negative Autoregulation von *EFG1* ist (Tebarth, 2001). Durch Gelretardierungs-Experimente konnte in dieser Arbeit die Bindung von Efg1 in einem *C. albicans* Rohextrakt an ein 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors gezeigt werden. Bei einer Footprint-Analyse mit dem 408 bp-Fragment konnte mit rekombinantem Efg1 aus *E. coli* eine 13 bp-große Region als Bindestelle von Efg1 ausgemacht werden (Bußmann, 2006). Die Analyse dieses DNA-Fragments ließ die dreifache Sequenzwiederholung des Palindroms TATGCATA als DNA-Zielsequenz von Efg1 vermuten, welche als APSES response element bezeichnet wird. Die in dieser Arbeit durchgeführte Ein-Hybrid-Analyse in *S. cerevisiae* konnte zwar die Bindung von Efg1 an das 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors bestätigen, identifizierte allerdings nicht das ARE-Motiv als einzige Bindesequenz von Efg1.

Das *EFG1*-Gen besitzt eine ungewöhnlich große intergenische Region von ca. 10 kb. Innerhalb dieser Region können noch viele ARE oder ARE-ähnliche Motive identifiziert werden. Die bisher erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass das ARE-Bindemotiv an der Efg1-vermittelten Regulation beteiligt ist. Da bei einer Deletion des 408 bp-Fragments dennoch eine Repression des *EFG1*-Gens beobachtet werden konnte, handelt es sich wahrscheinlich nicht um die einzige für die Regulation erforderliche Region. So wäre es möglich, dass verschiedene DNA-Bindemotive für die Regulation benötigt werden oder sich in ihrer Funktion kompensieren können. Durch Dimerisierung mit unterschiedlichen Interaktionspartnern könnten unterschiedliche Präferenzen hinsichtlich der spezifischen Binderegion vorliegen.

Die meisten der 26 in Abhängigkeit von Efg1 regulierten Gene weisen ein ARE identisches oder ähnliches Motiv auf. So wurde durch eine detaillierte Promotoranalyse der von Efg1 regulierten Gene *HWP1* und *ALS3* gezeigt, dass diese unterschiedliche Varianten der TATGCATA Sequenz beinhalten. Der Promotor, der als A1 bezeichneten Region von *ALS3,* zeigt sogar ein identisches ARE-Motiv auf. Auch in den Promotorregionen der Gene *YWP1* und *SAP2* können neben anderen auch ARE-ähnliche Motive gefunden werden.

5 Zusammenfassung

APSES-Proteine sind „basic helix-loop-helix“ (bHLH)-Transkriptionsfaktoren in Ascomyceten, die die Morphogenese zwischen kugelförmigen und filamentösen Zellformen regulieren. Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* enthält mit Efg1 und Efh1 zwei zur Familie der APSES-Proteine gehörende Transkriptionsfaktoren. Die molekularen Mechanismen der Zielgenerkennung und die posttranslationalen Modifikationen von APSES-Proteinen sind noch weitgehend unklar.

Das Efg1-Protein wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Dekahistidin-Epitop heterolog in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* und homolog in *C. albicans* produziert und durch Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt. Das aus *E. coli* isolierte Efg1-Protein wurde erfolgreich zur Herstellung eines polyklonalen Anti-Efg1-Antiserums in Kaninchen eingesetzt. Das Anti-Efg1-Antiserum eignete sich zur Identifikation von Efg1 in *C. albicans* Rohextrakten und zur Immunpräzipitation von Efg1. Mit Hilfe von deletierten Efg1-Varianten konnte gezeigt werden, dass das Anti-Efg1-Antiserum mit mehreren Efg1-Epitopen interagiert.

In Immunoblot-Analysen konnte Efg1, das aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* isoliert worden war, als Dreifachbande mit molekularen Massen von 75, 83 und 88 kDa detektiert werden. Behandlung mit Lambda-Proteinphosphatase führte zum Abbau der 88 und 83 kDa Proteine zugunsten des 75 kDa Proteins. Da aus *E. coli* isoliertes Efg1 eine molekulare Masse von 75 kDa aufweist, kann angenommen werden, dass die 83 und 88 kDa Varianten auf Phosphorylierungen zurückzuführen sind, wobei das 83 kDa-Phosphoprotein die Hauptform von Efg1 darstellt. Analyse des Phosphorylierungszustands von deletierten Efg1 Varianten zeigte, dass lediglich die Deletion der konservierten APSES/bHLH Domäne zu einem Verlust der Phosphorylierung führte. Zudem konnte im zeitlichen Verlauf nach Hypheninduktion eine Änderung des Efg1-Phosphorylierungsmusters im Immunoblot festgestellt werden, wobei die 88 kDa Form ab- und die 83 kDa Form zunahm. Die Efg1-Phosphorylierung erfolgt unerwarteterweise nicht durch Proteinkinase A (PKA), da *tpk1* und *tpk2* Mutanten ein unverändertes Efg1 Phosphorylierungsmuster zeigten. Das Efg1 Phosphorylierungsmuster veränderte sich ebenfalls nicht bei hypoxischem Wachstum, obwohl Efg1 unter diesen Bedingungen als Repressor und nicht als Aktivator wirkt.

Transkriptionsfaktoren des bHLH-Typs bilden typischerweise Homo- oder Heterodimere, die für Efh1, aber nicht für Efg1 durch Zweihybriduntersuchungen bisher nachgewiesen wurden. Durch Gelfiltrationschromatographie wurde die molekulare Masse von gereinigtem Efg1 aus *E. coli* und aus *C. albicans* mit ca. 180 kDa bestimmt, die einem Homodi- oder -trimer entspricht. Spontane Homodimerisierung ist vermutlich die Voraussetzung für die DNA-Bindung von gereinigtem Efg1, die durch Verzögerungsgele mit einem *EFG1* Promotorfragment nachgewiesen wurde.

Die erhaltenen Ergebnisse bilden die Voraussetzung für weiterführende Arbeiten zur Klärung der Phosphorylierungsstellen von Efg1, der beteiligten Kinasen und der dreidimensionalen Struktur von Efg1.

6 Summary

APSES proteins are „basic helix loop helix“ (bHLH)-transcription factors in ascomycetes which regulate morphogenesis between a yeast and a filamentous growth form. The human fungal pathogen *Candida albicans* contains two transcription factors, Efg1 and Efh1, which are members of the APSES-family. Molecular mechanisms of gene regulation by APSES proteins and their posttranslational modifications are largely unknown.

The decahistidine-tagged Efg1 fusion protein was produced in the heterologous hosts *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and in the homologous host *C. albicans* and was purified by metal affinity chromatography. *E. coli*-produced Efg1 protein was used successfully for the production of a polyklonal rabbit anti-Efg1 antiserum. The antiserum was suitable for the detection of Efg1 in *C. albicans* crude extracts and to immunoprecipitate Efg1. With the help of Efg1 deletion variants it could be shown that the anti-Efg1 antiserum interacts with several epitopes of Efg1.

Efg1 isolated from *S. cerevisiae* and *C. albicans* could be detected by immunoblotting following SDS-PAGE as a triple band with apparent molecular masses of 75, 83 and 88 kDa. Treatment with lambda phosphatase led to degradation of the 88 and 83 kDa proteins in favour of the 75 kDa protein. Because *E. coli*-produced Efg1 migrates as a 75 kDa protein it is concluded that the 83 and 88 kDa variants are phosphoproteins and that the 83 kDa phosphoprotein represents the main form of Efg1. Analysis of the phosphorylation status of Efg1 deletion variants showed that only the deletion of the conserved APSES/bHLH domain led to a loss of Efg1 phosphorylation. A time-dependent change of the Efg1 phosphorylation status could be observed after hyphae induction, in which the 88 kDa form decreased and the 83 kDa form increased. Unexpectedly, the phosphorylation of Efg1 appeared not to be caused by protein kinase A, because *tpk1* and *tpk2* mutants showed unchanged Efg1 phosphorylation patterns. The Efg1 phosphorylation pattern also did not change under hypoxia, although Efg1 functions under these conditions as a repressor and not as an activator.

Transcription factors of the bHLH type typically form homo- or heterodimers, which were previously confirmed for Efh1 by two-hybrid analysis but not for Efg1. By gel filtration chromatography the apparent molecular mass of Efg1 purified from *E. coli* and *C. albicans* was determined as approximately 180 kDa corresponding to a homodi- or -trimer. Spontaneous homodimerization is probably the precondition for DNA binding of purified Efg1, which was proven by a gel retardation assay using a *EFG1* promoter fragment.

The obtained results are the prerequisite to identify Efg1 phosphorylation sites, to identify the kinases involved and to establish the three dimensional structure of Efg1.

7 Literaturverzeichnis

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

Anderson, J.B., Wickens, C., Khan, M., Cowen, L.E., Federspiel, N., Jones, T. and Kohn, L.M. (2001).
Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of *Candida albicans.*
J Bacteriol *183*, 865-872

Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R. and Metzenberg, R. (1996).
Asm-1^{+}, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development.
Genetics *144*, 991-1003

Atchley, WR., Wollenberg, KR., Fitch, WM., Terhalle, W. and Dress, AW. (2000).
Correlations among amino acid sites in bHLH protein domains: an information theoretic analysis.
Mol Biol Evol *17*, 164-78

Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N. (1993).
Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity.
Cell *72,* 211-222

Baneyx, F. (1999).
Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.
Curr Opin Biotechnol *10,* 411-421

Bennet, R.J. and Johnson, A.D. (2003).
Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains.
EMBO J *10*, 2505-2515

Bergstrom, D.A., and Tapscott, S.J. (2001).
Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family.
Mol Cell Biol *21*, 2404-2412

Bernards, R. (1995).
Transcriptional regulation flipping the Myc switch.
Curr Biol *5*, 859-861

Blackwood, E.M. and Eisenmann, R.N. (1991).
Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc.
Science *251,* 1211-1217

Bockmühl, D.P. (2001).
Regulation der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida* a*lbicans* durch Komponenten eines cAMP-abhängigen Signalweges.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität

Bockmühl, D.P. and Ernst, J.F. (2001).
A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*.
Genetics *157*, 1523-1530

Bockmühl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. and Ernst, J.F. (2001).
Distinct and redundant roles of the two protein kinase a isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*.
Mol Microbiol *42*, 1243-1257

Borneman, A.R., Hynes, M.J. and Andrianopoulos, A. (2002).
A basic helix-loop-helix protein with similarity to the fungal morphological regulators, Phd1p, Efg1 and StuA, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffei*.
Mol Microbiol *3,* 621-631

Bouchard, C., Staller, P. and Eilers, M. (1998).
Control of cell proliferation by Myc.
Trends in Cell Biol *8,* 202-208

Bradford, M.M. (1976).
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem *72,* 248-254

Buffo, J., Herman, M.A. and Soll, D.R. (1984).
A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*.
Mycopathologia *85,* 21-30

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987).
XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection.
BioTechniques *5,* 376-378

Bußmann, M. (2006).
Untersuchungen zur Zielsequenz-Erkennung des Transkriptionsregulators Efg1 aus *Candida albicans.*
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L. and Cantore, M.L. (2004).
Candida albicans lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase a displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic Subunit.
Eukaryot Cell *3*, 190-199

Cassone, A., Sullivan, P.A. and Sheperd, M.G. (1985).
N-Acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*.
Microbiologica *8*, 85-99

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T. and Ghannoum, M. A. (2001).
Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance.
J Bacteriol *183*, 5385-5394

Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B. and Entian, K.D. (1999).
The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Gen Genet *261*, 740-752

Chen, J., Chen, J., Lane, S. and Liu, H. (2002).
A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*.
Mol Microbiol *46*, 1335-1344

Cormack, B.P., Bertram, G., Gow, N.A.R., Falkow, S. and Brown, A.J.P. (1997).
Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP)a reporter of gene expression in *Candida albicans*. Microbiology *143*, 303-311

Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. and White-way, M. (1998).
Roles of the *Candida albicans* Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog, Cek1p, in Hyphal Development and Systemic Candidiasis.
Infect Imm *66*, 2713-2721

Cutler, J.E. (1991).
Putative virulence factors of *Candida albicans*.
Annu Rev Micobiol *45*, 187-218

Daniels, KJ., Srikantha, T., Lockhart, SR., Pujol, C. and Soll, DR. (2006).
Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*.
EMBO J *25*, 2240-2252

Davis, D., Edwards, J.E. Jr, Mitchell, A.P. and Ibrahim, A.S. (2000).
Candida albicans RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions.
Infect Immun *10*, 5953-5959

D'Enfert, C., Goyard, S., Rodriguez-Arnaveilhe, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaia, F., Bader, O., Albrecht, A., Castillo, L., Dominguez, A., Ernst, J. F., Fradin, C., Gaillardin, C., Garcia-Sanchez, S., de Groot, P., Hube, B., Klis, F. M., Krishnamurthy, S., Kunze, D., Lopez, M. C., Mavor, A., Martin, N., Moszer, I., Onesime, D., Perez-Martin, J., Sentandreu, R., Valentin, E. and Brown, A.J. (2005).
CandidaDB: a genomic database for *Candida albicans* pathogenomics.
Nucl Ac Res *33*, 353-357

Dujardin, L., Walbaum, S. and Biguet, J. (1980a).
Chlamydosporulation in *Candida albicans. C*ourse of the morphogenesis; influence of light and sowing density.
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.

Doedt, T. (2000).
Untersuchungen zur Regulation und DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors Efg1 aus *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Doedt, T. (2003).
Transkriptionelle Steuerung von Morphogenese und Metabolismus des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch die APSES-Proteine Efg1 und Efh1p.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmühl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russel, C.L., Brown, A.J.P. and Ernst, J.F. (2004).
APSES-Proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*.
Mol Biol Cell *15*, 3167-3180

Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. and Tanaka, K. (1992).
Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species.
J Gen Microbiol *138*, 2243-2251

Ellenberger, T. (1994).
Getting a grip on DNA structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix loop helix DNA binding domains.
Curr Op Struct Biol *4*, 12-21

Enjalbert, B., Nantel, A. and Whiteway, M. (2003).
Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response.
Mol Biol Cell *14*, 1460-1467

Ernst, J.F. (2000).
Transcriptionfactors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis.
Microbiology *146*, 1763-1774

Feng, Q., Summers, E., Guo, B. and Fink, G. (1999).
Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*.
J Bacteriol *181*, 6339-6346

Ferre-d'Amare, A.R., Prendergast, G., Ziff, E.B. and Burley, S.K. (1993).
Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain.
Nature *363*, 38-45

Ferré-D'Amaré, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G. and Burley, S. K. (1994).
Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF.
EMBO J *1*3, 180-189.

Fonzi, W. and Irwin, Y. (1993).
Isogenec strain construction and gene mapping in *Candida albicans.*
Genetics *134*, 717-728

Garaizar, J., Brena, S., Bikandi, J., Rementeria, A. and Ponton, J. (2006).
Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans.*
FEMS Yeast Res *6*, 987-998

Ghannoum, MA., Jurevic, RJ., Mukherjee, PK., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A. and Gillevet, PM. (2010).
Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals.
PloS Pathog *8*, 6(1):e1000713

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

Gimeno, C.J. and Fink, G.R. (1994).
Induction of pseudohyphal growth by overepression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development.
Mol Cell Biol *14*, 2100-2112

Giusani, A.D., Vinces, M. and Kumamoto, C.A. (2002).
Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1-mediated repression.
Genetics *160*, 1749-1753

Golemis, E.A. and Khazak, X. (1994).
Alternative yeast two-hybrid system: The interaction trap and interaction mating.
Methods in Molecular Biology, Kapitel 60

Gow, N.A., Brown, A.J. and Odds, F.C. (2002).
Fungal morphogenesis and host invasion.
Curr Opin Microbiol *5*, 366-371

Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T.G. and Vilgalys, R. (1996).
Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination.
Proc Natl Acad Sci (USA) *93*, 12473-12477

Halliwell, C.M., Morgan, G., Ou, C.P. and Cass, A.E. (2001).
Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules.
Anal Biochem *295*, 257-261

Hanahan, D. (1983).
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol *166*, 557-580

Hervouet, E., Simonnet, H. and Godinot, C. (2008).
Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer.
Biochemie *89*, 1080-1088

Hilbig, J. (2004).
Untersuchungen zur DNA-Bindespezifiät des morphologischen Regulators Eg1p des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans.*
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hochuli, E., Dobeli, H. and Schnacher, A. (1987).
New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.
J Chromatog *411*, 177-184

Hostetter, M.K. (1994).
Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp*. with epithelial and endothelial surfaces.
Clin Microbiol Rev *7*, 29-42

Hull, C.M., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2000).
Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host.
Science *289*, 307-310

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001).
A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome.
Proc Nat Acad Sci USA *98*, 4569-4574

James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996).
Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient Two-Hybrid selection in yeast.
Genetics *144*, 1425-1436

Johnson, S.E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E.J. and Konieczny, S.F. (1996).
Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation.
Mol Cell Biol *16*, 1604-1613

Joshi, K.R., Solanki, A. and Prakash, P. (1993).
Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80.
Indian J Pathol Microbiol *36*, 48-52

Jung, W.H. and Stateva, L.I. (2003).
The cAMP phosphodiesrerase encoded by *PDE2* is required for hyphale development in *Candida albicans*.
Microbiology *10*, 2961-2976

Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991).
Consensus Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases.
J Biol Chem *266*, 15555-15558

Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. and Nasmyth, K. (1993).
A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase.
Science *261*, 1551-1557

Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y. and Nomoto, A. (2001).
Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation.
Mol Cell Biol *21*, 6139-50

Kumamoto, C.A., and Vinces, M.D. (2005).
Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence.
Cell Microbiol *7*, 1546-1554

Kurtz, D. (2007).
Untersuchungen zur Funktion von „MCB-BOX"-Sequenzen bei der Genregulation von *Candida albicans.*
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J. and Soll, D.R. (1999).
Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection.
Infect Immun *67*, 6652-6662

Kvaal, C.A., Srikantha, T. and Soll, D.R. (1997).
Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence.
Infect Immun *65*, 4468-4475

Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J. and Soll, D.R. (2003).
Skin facilitates *Candida albicans* mating.
Infect Immun *71*, 4970-4976

Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature *227*, 680-685

Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L. and Friedman, L. (1975).
Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: Relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis.
Infect Immun *11*, 1014-1023

Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. and Liu, H. (2001a).
The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via *TEC1*.
Mol Cell Biol *19*, 6418-6428

Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y., and Schroppel, K. (2001).
Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*.
Mol Microbiol *42*, 673-687

Leng, P., Lee, P.R., Wu, H and Brown, A.J.P. (2001).
Efg1, a Morphogenetic Regulator in *Candida albicans,* Is a Sequence-Specific DNA Binding Protein.
J Bacteriol *183*, 4090-4093

Leuker, C. E., Hahn, A. M. and Ernst, J. F. (1992).
β-Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as a reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C .tropicalis*.
Mol Gen Genet *245*, 212-217

Leuker, C.E. and Ernst, J.F. (1994).
Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (antiKodon CAG) in the pathogen *Candida albicans: in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG Kodons.
Mol Gen Genet *245*, 212-217

Li, B., Carey, M. and Workman, JL. (2007).
The role of chromatin during transcription.
Cell *23*, 707-719

Liu, H., Kohler, J. and Fink, G.R. (1994).
Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog.
Science *266*, 1723-1726

Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G.R. (1997).
Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent.
Cell *90*, 939-949

Lowndes, N.F., McInerny, C.J., Johnson, A.L., Fantes, P.A. and Johnston, L.H. (1992a).
Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene *cdc10+*.
Nature *355*, 449-453

Lowndes, N.F., Johnson, A.L., Breeden, L. and Johnston, L.O. (1992b).
Swi6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast.
Nature *357*, 505-508

Lu, Y., Su, C., Mao, X., Raniga, PP., Liu, H. and Chen J. (2008).
Efg1-mediated recruitment of NuA4 to promoters is required for hypha-specific Swi/Snf binding and activation in *Candida albicans*.
Mol Biol Cell *10*, 4260-4272 Epub

Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H. and Pabo, C.O. (1994).
Crystal structure of MyoD bHLH domain DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation.
Cell *77*, 451-459

Magee, B.B. and Magee, P.T. (2000).
Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTLa and MTLalpha strains.
Science *289*, 310-313

Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M. and Magee, P.T. (2002).
Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans.*
Mol Microbiol *46*, 1345-1351

Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J.M. and Van Dijck, P. (2005).
The G protein-coupled Receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans.*
Mol Biol Cell *16*, 1971-1986

Martinez, M.D., Lundbäck, AK., Niegowski, D. and Eshaghi, S. (2008).
Expression and purification of the recombinant membrane protein YidC: A case study for increased stability and solubility.
Protein Expression and Purification *62*, 49-52

Massari, M.E. and Murre, C. (2000).
Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms.
Mol Cell Biol *20*, 429-440

Matthew, B.L. and Alexander, D.J. (2009).
White–opaque switching in *Candida albicans.*
Curr Opin in Microbio *12*, 650-654

McIntosh, E. (1993).
MCB elements and the regulation of DNA replication genes in yeast.
Curr Genet *24*, 185-192

Miller, J. (1972).
Experiments in Molecular Genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1, 1-11

Miller, K.Y., Wu, J. and Miller, B.L. (1992).
StuA is required for cell pattern formation in Aspergillus.
Genes and Development *6*, 1770-1782

Miller, M.G. and Johnson, A.D. (2002).
White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating.
Cell *3*, 293-302

Miwa, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Yun, C.W., Schell, W.A., Perfect, J.R., Kumagai, H. and Tamaki, H. (2004).
Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans.*
Eukaryot Cell *3*, 919-931

Morschhäuser, J., Michel, S. and Staib, P. (1999).
Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination.
Mol Microbiol *32*, 547-556

Müller, H., Ziegler, B. and Schweizer, B. (1993).
UV/VIS-Spektroskopie in der Nucleinsäureanalytik.
Bio Tec *4*, 25-29

Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. and Brown, A.J. (2001a).
Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors *Ca*Tup1, *Ca*Mig1 and *Ca*Nrg1.
Mol Microbiol *42*, 981-993

Murre, C., McCaw, P. S. and Baltimore, D. (1989).
A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins.
Cell *56*, 777-783.

Nguena, P. (2008).
Heterologe Expression und Aufreinigung von Transkriptionsfaktoren aus *Candida albicans.*
Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Norbeck, J. and Blomberg, A. (2000).
The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast *16*, 121-137

Noffz, C. (2006).
Regulation der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch Komponenten eines cAMP-abhängigen Signalweges.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Odds, F.C. (1988).
Candida and Candidosis.
2nd Edition, Bailliere Tindall, London

Odds, F.C. (1994).
Pathogenesis of Candida infections.
J Am Acad Dermatol *31*, 2-5

Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F. and Eilers, M. (1997).
An alternative pathway for gene regulation by Myc.
EMBO J *16*, 5672-5686

Pfaller, M.A. (1996).
Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission.
Clin Infect Dis *22*, 89-94

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975).
Metal chelat affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.
Nature *258*, 598-599

Quong, M.W., Massari, M.E., Zwart, R. and Murre, C. (1993).
A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells.
Molecular and Cellular Biology *13*, 792-800

Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. and Kumamoto, C. (1999).
Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture.
Infect Imm *67*, 3649-3652

Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. and Fink, G.R. (2000).
The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function.
Proc Natl Acad Sci USA *97*, 5984-5988

Robinson, K.A. and Lopes, J.M. (2000).
Survey and summary: *Saccharomyces cerevisiae* basic helixloop-helix proteins regulate diverse biological processes.
Nucleic Acids Res *28*, 1499-1505

Rocha, C.R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M. and Leberer, E. (2001).
Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*.
Mol Biol Cell *12*, 3631-3643

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

Sandovsky-Losica, H., Chauhan, N., Calderone, R. and Segal, E. (2006).
Gene transcription studies of *Candida albicans* following infection of HEp2 epithelial cells.
Med Mycol *44*, 329-334

Santos, M.A.S. and Tuite, M.F. (1995).
The CUG Kodon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*.
Nuc Acids Res *23*, 1481-1486

Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C. and Lopez-Ribot, J.L. (2003).
Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection.
Eukaryot Cell *5*, 1053-1060

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. and Schröppel, K. (2000).
The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*.
Mol Microbiol *3*, 435-445

Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C. and Ernst, J.F. (2006).
Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1-regulatory networks.
J Mol Biol *361*, 399-411

Shenhar, G. and Kassir, Y. (2001).
A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in Saccharomyces cerevisiae.
Mol Cell Biol *21*, 1603-1612

Shristava, A., Yu, J., Artandi, S. and Calame K. (1996).
YY1 and c-Myc associate *in vivo* in a manner that depends on c-Myc levels.
Proc Natl Acad Sci *93*, 10638-10641

Srikantha, T., Morrow, B., Schröppel, K. and Soll, D.R. (1996).
The frequency of integrative transformation at phase specific genes of *Candida albicans* correlates with their transkriptional state.
Mol Gen Genet *246*, 342-352

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

Smith, A., Ward, M.P. and Garret, S. (1998).
Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation.
EMBO J *17*, 3556-3564

Sonneborn, A. (1999).
Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Efg1 und der Proteinkinase A (Catpk2p) für die Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität

Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P. and Ernst, J.F. (1999a).
Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1 morphogenetic regulator.
Infect Immun *67*, 5514-5517

Sonneborn, A., Tebarth, B. and Ernst, J.F. (1999b).
Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1 morphogenetic regulator.
Infect Immun *67*, 4655-4660

Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K. and Soll, D.R. (2000).
EFG1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells.
J Bacteriol *182*, 1580-1591

Stempel, C. (2003).
Untersuchungen zur Funktion von Efh1p, eines Homologen des Efg1-Regulatorproteins von *Candida albicans.*
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Stichternoth, C. (2009).
Hypoxische Adaptation des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans.*
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Stichternoth, C. and Ernst, J.F. (2009).
Hypoxic Adaptation by Efg1 Regulates Biofilm Formation by *Candida albicans.*
Aplied and Enviromental Microbiology *75*, 3663–3672

Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. and Ernst, J.F. (1997).
Efg1, an essential regulator of morphogenesis of the human pahogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi.
EMBO J *16*, 1982-1991

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990).
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.
Methods Enzymol *185*, 60-89

Suckow, M. and Hollenberg, C.P. (1998).
The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p *in vivo* can be different form the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides *in vitro*.
J Mol Biol *276*, 887-902

Szafranski, E. (2007).
Untersuchungen zur Funktion von „E-Box"-Sequenzen bei der Genregulation von *Candida albicans.*
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tebarth, B. (2001).
Regulation der Expression des *EFG1*-Gens in der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A. and Ernst, J.F. (2003).
Adaptation of the Efg1 morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene.
J Mol Biol *329*, 949-962

Terpe, K. (2003).
Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.
Appl Microbiol Biotechnol *60*, 523-533

Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K.E. and Ernst, J.F. (2009).
Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Eukaryot Cell *8*, 913–915

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979).
Electrophoretic transfer of proteins form polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci USA *76*, 4350-4354

Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R.W. and Agabian, N. **(2001).**
Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans.*
Proc Natl Acad Sci USA 98, 3249–3253

Uhl, M.A. and Johnson, A.D. (2001).
Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*.
Microbiology *147*, 1189-1195

Vasquez-Torres, A. and Balish, E. (1997).
Macrophages in resistance to candidiasis.
Microbiol Mol Biol Rev *61*, 170-192

Vinces, M.D., Haas, C. and Kumamoto, C.A. (2006).
Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene *CZF1* and its regulation by Efg1 and Czf1p.
Eukaryot Cell *5*, 825-835

Wang, A., Raniga, P.P., Shelley, L., Lu, Y. and Liu, H. (2009).
Hyphal Chain Formation in *Candida albicans*: Cdc28-Hgc1 Phosphorylation of Efg1 Represses Cell Separation Genes.
Mol Cell Biol *29*, 4406–4416

Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R. and Garrett, S. (1995).
SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription.
Mol Cell Biol *15*, 6854-6863

Weide, M.R. and Ernst, J.F. (1999).
Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans.*
Mycoses *42*, 61-67

Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F. and Wenzel, R.P. (1988).
Hospital-acquired candidemia: the attribute mortality and excess length of stay.
Arch Inter Med *148*, 264-265

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*, 1868-74

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W. (1989).
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.
Nuc Acids Res *17*, 3469-3478

Xu, X.L., Lee, R.T., Fang, H.M., Wang, Y.M., Li, R., Zou, H., Zhu, Y. and Wang, Y. (2008).
Bacterial peptidoglycan triggers Candida albicans hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p.
Cell Host Microbe *4*, 29-39

Zimmermann, F.K. (1975).
Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mut Res *31*, 71-86

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
β-gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C. albicans	*Candida albicans*
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASA	Casaminosäuren
Cm	Chloramphenicol
C-terminal	carboxyterminal
DAPI	4’,6-Diamidino-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E .coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-
His	Histidin
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidasegen aus *E. coli*
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat

µ	mikro
M	Molar
MAT	mating type locus
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTL	mating-type-like locus
N	variable DNA-Base
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-terminal	aminoterminal
OD_{420}	optische Dichte bei 420 nm
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
p.a.	per analysis
PAA	Polyacrylamid
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pers.	persönliche
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	ProteinkinaseA
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SD	synthetisches Minimalmedium mit Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TWEEN	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
YNB	Yeast nitrogen base (Hefe Stickstoffbasis)
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

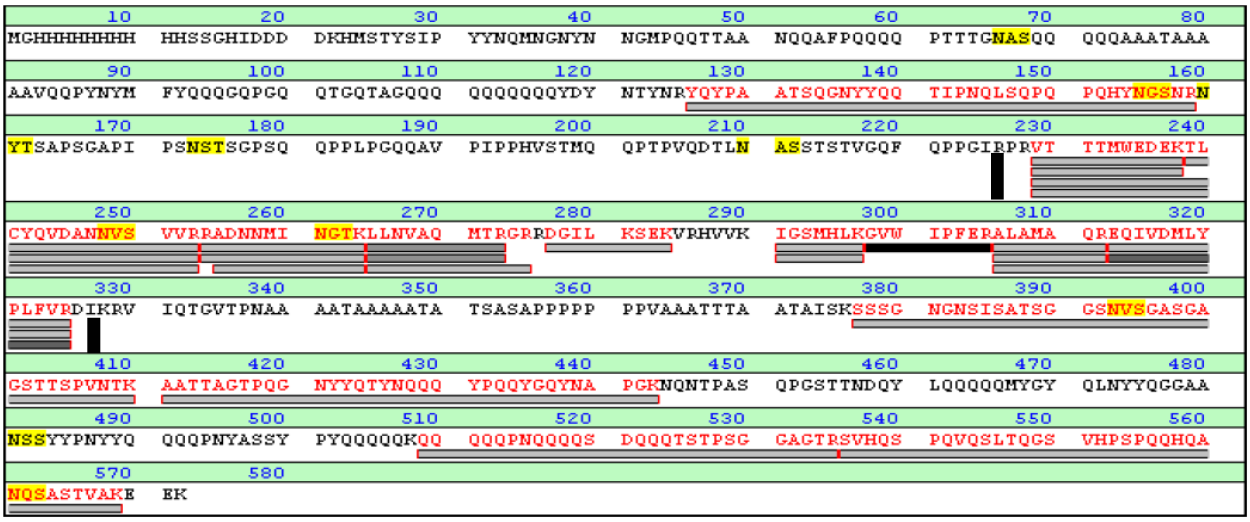
9 Anhang

Tab. 9.1: Daten der massenspektroskopischen Analyse von Efg1. Für die Analyse wurde das Efg1-Protein aus einem Coomassie-gefärbien SDS-Gel ausgeschnitten. Die identifizierten Peptid-Sequenzen von Efg1 sind grau unterlegt und in roter Schrift dargestellt. Die APSES Domäne befindet sich an Position 226-327. Beginn und Ende der APSES-Domäne sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.

Sequence data:

8426_8429

Intensity Coverage:	60.2 % (361610 cnts)	Sequence Coverage MS:	44.1%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	9.4



Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle besonders bei Herrn Professor Dr. J.F. Ernst für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung sowie die Rat- und Vorschläge bezüglich meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Wagner möchte ich herzlich für die Übernahme des Korefferats danken.

Theres Lassak, Isabel Eichhof und Denis Tielker danke ich speziell für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Bei allen anderen Mitgliedern der AG Ernst möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsamen Unternehmungen bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Daniel, die mich während der gesamten Zeit unterstützt, mich immer wieder motiviert und meine Launen ertragen haben.

Erklärung

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

Düsseldorf, 8.11.2010

(Dagmar Kurtz)