

**Regulation der Expression des *EFG1*-Gens
in der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes
*Candida albicans***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von

Bernd Tebarth

aus Kempen

Düsseldorf
2001

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

Referent: Prof. Dr. J. F. Ernst

Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2001

1.	Einleitung	
2.	Material und Methoden	
2.1	Chemikalien und Enzyme	14
2.2	Stämme und Medien	14
2.2.1	<i>E.coli</i> -Stämme	14
2.2.2	<i>C.albicans</i> -Stämme	14
2.2.3	Medien zur Anzucht von Bakterien	15
2.2.4	Medien zur Anzucht von Hefen	15
2.2.5	Spezielle Medien	15
2.2.5.1	Hypheninduktion	15
2.2.5.2	β -Galaktosidase-Screening	15
2.2.5.3	<i>PCK1p</i> -Induktion	15
2.3	Vektoren und Primer	16
2.3.1	Basisvektoren	16
2.3.2	Vektorkonstruktionen	16
2.3.3	Synthetische Oligonukleotide	18
2.4	Transformation	19
2.4.1	Transformation von <i>E.coli</i>	19
2.4.2	Transformation von <i>C.albicans</i>	19
2.5	Methoden zur Analyse von DNA	19
2.5.1	Klonierung	19
2.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	19
2.5.4	Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe	20
2.5.5	Sequenzierung	20
2.5.6	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.5.7	Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über Southern-Blot-Analyse	20
2.6	Methoden zur Analyse von RNA	21
2.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe	21
2.6.2	Präparation von mRNA	21
2.6.3	5'RACE	21
2.6.4	Restriktion von RNA mit RNaseH	21
2.6.5	Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über Northern-Blot-Analyse	21
2.7	Methoden zur Analyse von Proteinen	22
2.7.1	Herstellung von Rohextrakten aus Hefe	22
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	22
2.7.3	Messung der β -Galaktosidase-Aktivität	23
2.7.4	Messung der Luciferase-Aktivität	23
2.8	Disruption der 5'UTR des langen <i>EFG1</i>-Transkriptes	23

3. Ergebnisse

3.1	Northern-Analyse der <i>EFG1</i>-Expression	24
3.2	Kartierung der <i>EFG1</i>-Transkripte	25
3.2.1	Northern-Analyse des Haupttranskriptes nach RNaseH-Restriktion	25
3.2.2	5'RACE des <i>EFG1</i> -Haupttranskriptes	27
3.2.3	5'RACE des <i>EFG1</i> -Nebentranskriptes	28
3.3	Subklonierung und Sequenzierung des <i>EFG1</i>-Hauptpromoters	28
3.4	Disruption der 5'UTR des langen <i>EFG1</i>-Transkriptes	30
3.4.1	Disruption in den Stämmen CAI4, CAI8 und BCa14.1	30
3.4.2	Transkriptanalyse in den 5'UTR-Deletionsstämmen	32
3.4.3	Phänotypen der 5'UTR-Deletion	32
3.4.4	Einfluß der FRT-Sequenz auf die Expression	34
3.5	Überexpression des langen <i>EFG1</i>-Transkriptes	35
3.6	<i>LAC4</i>-Fusionen der <i>EFG1</i>-Promotoren	36
3.7	Autoregulation des <i>EFG1</i>-Hauptpromoters	37
3.7.1	Northern-Analyse der Autoregulation der <i>EFG1</i> -Promotoren	39
3.7.2	Deletionsanalyse des <i>EFG1</i> -Hauptpromoters	40
3.7.2.1	<i>LAC4</i> als episomal exprimiertes Reporter gen	40
3.7.2.2	<i>LAC4</i> als integriertes Reporter gen	43
3.7.2.3	<i>RLUC</i> als integriertes Reporter gen	44
3.7.3	Überproduktion von Efg1p-Varianten	46
3.7.4	Autoregulation in <i>tup1</i> - und <i>cap1</i> - Mutanten	46
3.7.5	Autoregulation in <i>sir2</i> -Mutante	47
3.8	Regulation der <i>EFG1</i>-Expression	49
3.8.1	Hypheninduktion	49
3.8.2	<i>TPK1/TPK2</i> -Überexpression	50
3.8.3	<i>EFH1</i> -Überexpression	51
3.8.4	White-/Opaque-Phänotypwechsel	52
3.9	<i>EFH1</i>-Expression im Phänotypwechsel	54
3.10	Regulation der <i>TPK1/TPK2</i>-Expression	56

4.	Diskussion	
4.1	Bestimmung der <i>EFG1</i>-Transkriptionsstartpunkte	58
4.1.1	Der <i>EFG1</i> -Locus generiert ein 3,2 kb Haupttranskript und ein 2,1 kb Nebentranskript	59
4.1.2	Das lange <i>EFG1</i> -Transkript enthält eine 1,2 kb große 5'UTR	60
4.2	Sequenz des <i>EFG1</i>-Hauptpromotors	60
4.2.1	Der 5'-flankierende Bereich von <i>EFG1</i> stellt eine große intergenische Region dar	60
4.3	Funktion der 5'UTR des langen <i>EFG1</i>-Transkriptes	61
4.3.1	5'UTR-Deletionsstämme zeigen Defekte im Hyphenwachstum	62
4.4	Promotorfunktion der 5'-flankierenden Region von <i>EFG1</i>	63
4.4.1	Die <i>EFG1</i> -Expression wird durch einen Haupt- und einen Neben-Promotor reguliert	63
4.5	Autoregulation des <i>EFG1</i>-Hauptpromotors	64
4.5.1	Die Autoregulation von <i>EFG1</i> findet auf Transkriptionsebene statt	65
4.5.2	Der <i>EFG1</i> -Hauptpromotor unterliegt einer 10fachen negativen Autoregulation	65
4.5.3	Ein minimaler 45 bp großer Promotor vermittelt eine vollständige autoregulatorische Repression	66
4.5.4	Phosphorylierungsmutanten von Efg1p zeigen volle Autoregulation	67
4.5.5	Tup1p und Cap1p sind nicht an der Autoregulation beteiligt	67
4.5.6	Die Deletion von <i>SIR2</i> verändert die genomische <i>EFG1</i> -Expression	68
4.5.7	Modell der Autoregulation	69
4.6	Regulation der <i>EFG1</i>-Expression	70
4.6.1	Die Aktivität des <i>EFG1</i> -Hauptpromotors bleibt während der Hypheninduktion konstant	70
4.6.2	Die Überexpression von <i>TPK1</i> und <i>TPK2</i> reprimiert den <i>EFG1</i> -Hauptpromotor	71
4.6.3	<i>EFH1</i> -Überexpression reprimiert den <i>EFG1</i> -Hauptpromotor	72
4.6.4	Die Expression von <i>EFG1</i> korreliert mit dem „white/opaque“-Phänotypwechsel	72
4.7	<i>EFH1</i>-Expression im Phänotypwechsel	74
5.	Zusammenfassung	75
6.	Literaturverzeichnis	76
7.	Abkürzungen	98
8.	Anhang	99

1 Einleitung

Candida albicans – Klinische Bedeutung und Therapie

Pilze und insbesondere Hefen haben in den letzten Jahren eine beachtliche Bedeutung für den Menschen gewonnen. Das Spektrum reicht vom ökonomischen und wissenschaftlichen Nutzen bis hin zur lebensbedrohlichen Infektion.

Auf der einen Seite des Spektrums steht die Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, der neben ihrer traditionellen Funktion in Fermentationsprozessen auch eine Rolle als eukaryontischer Modellorganismus in der molekulargenetischen Forschung zukommt. Die vollständige Sequenzierung des Genoms dieses apathogenen Pilzes, der mit einer Generationszeit von 90 Minuten und der Bildung haploider Sporen nahezu optimale Eigenschaften als „Labororganismus“ besitzt, stellte einen Meilenstein in der Hefeforschung dar, der durch die Entwicklung der „Microarray“-Technologie neue Möglichkeiten zur Untersuchung des Transkriptoms und des Proteoms von *S. cerevisiae* eröffnet.

Auf der anderen Seite des Spektrums befinden sich Hefen, welche direkt oder indirekt eine schädliche Wirkung auf den Menschen entfalten. Die Infektion von Getreide und Futterpflanzen mit der Hefeform des pflanzenpathogenen Pilzes *Ustilago maydis* führt beispielweise über die Minderung der Ernteerträge zu wirtschaftlichen Verlusten. Eine unmittelbare Bedrohung geht von humanpathogenen Hefen, z.B. *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* aus. Beide Organismen werden als opportunistische Erreger bezeichnet, da ein geschwächtes Immunsystem des Wirtes die Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion darstellt.

Als fakultativ intrazellulärer Parasit besitzt *C. neoformans* die Fähigkeit, nach der Infektion des Menschen über die Lunge in den Makrophagen zu überleben. Die Ausbreitung im Zentralnervensystem führt letztendlich zum Krankheitsbild einer Meningoenzephalitis.

C. albicans gilt als der bedeutendste humanpathogene Pilz. Drei Viertel aller nosokomialen Pilzinfektionen werden auf *C. albicans* zurückgeführt (Jarvis, 1995). Als Bestandteil der mikrobiellen Flora des Menschen besiedelt er die Schleimhäute des gastrointestinalen und urogenitalen Traktes. In mindestens einem Drittel der Gesamtbevölkerung wurde *C. albicans* oropharyngial oder gastrointestinal nachgewiesen (Milatovic *et al.*, 1997). Drei Viertel aller Frauen zeigen einmal in ihrem Leben eine durch *Candida* spp. hervorgerufene Vaginitis, ca. 20 % sind mehrfach betroffen (Fidel *et al.*, 1999). Die sogenannte „Windeldermatitis“ ist bei Säuglingen weit verbreitet. Menschen mit einem intakten Immunsystem entwickeln lediglich lokal begrenzte Candidosen der Haut und der Schleimhäute, welche einer Therapie mit Antimykotika relativ leicht zugänglich sind. Eine Immunsuppression des Menschen erleichtert *C. albicans* sowohl die Infektion als auch die systemische Ausbreitung im Wirt. Die Zahl von Personen mit einem kurzzeitig geschwächten oder dauerhaft geschädigten Immunsystem hat gerade durch die Entwicklung der Medizin in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Die Therapie von Krankheiten und Infektionen mit Cytostatika, Breitspektrumantibiotika und Corticosteroiden beeinträchtigt neben dem Gleichgewicht der natürlichen mikrobiellen Flora des Menschen auch sein Immunsystem. Die Entwicklung der Organtransplantation hat darüber hinaus eine weitere „Zielgruppe“ für *C. albicans* geschaffen, da die medikamentöse Immunsuppression zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen die lokale oder systemische Ausbreitung des opportunistischen Pilzes erleichtert. Intravenöse Katheter, welche bei den zuvor beschriebenen Behandlungen häufig zum Einsatz kommen, stellen als potentieller Infektionsort ebenso einen Risikofaktor dar, wie die parenterale Ernährung.

Der HIV-Infektion des Menschen kommt jedoch die bei weitem größte Bedeutung für die steigende Zahl von Pilzinfektionen zu. Die AIDS-Erkrankung ist durch einen stetig zunehmenden Zerfall des Immunsystems gekennzeichnet. Die auftretenden bakteriellen Infektionen sind trotz der zunehmenden Resistenzen mit Antibiotika weitgehend therapierbar. Die ständige Immunsuppression erleichtert aber auch eukaryontischen Erregern und Parasiten (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *C. neoformans*, *Pneumocystis* spp., *Cryptosporidium* spp.) die Besiedlung des Wirtes. So wurde beispielsweise bei 90 % aller AIDS-Patienten eine orale Candidose diagnostiziert (Greenspan, 1994). Im weiteren Verlauf der „erworbenen Immundefizienz“ entwickelt sich mit der Verbreitung im gesamten Körper eine systemische Candidose, die eine Mortalitätsrate von 35 % aufweist (Wenzel, 1995).

Die Therapie von Pilzkrankungen des Menschen wird durch die Gemeinsamkeit von Pilz- und humanen Zellen als Eukaryonten erschwert. Zur erfolgreichen Bekämpfung von Pilzen stehen nur wenige Wirkstoffe zur Verfügung. Um unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren, bilden pilzspezifische Komponenten von Zellmembranen und Stoffwechselwegen die Angriffspunkte für Antimykotika. Bei den beiden meistverwendeten Therapeutika Amphotericin B und Nystatin handelt es sich um Polyene, welche mit dem pilzspezifischen Membranbestandteil Ergosterol interagieren und dadurch die Zellmembran permeabilisieren und die Pilzzellen abtöten. Die Membran des Pilzes kann auch durch die Hemmung der Ergosterolsynthese geschädigt werden. In dieser Weise wirken die Azolderivate Ketoconazol, Fluconazol und Itraconazol. Das Nukleosidanalogen 5'-Fluorocytosin stellt einen weiteren fungiziden Wirkstoff dar. Es kann nur von Pilzen zu 5'-Fluoruracil metabolisiert werden, welches die RNA-Synthese inhibiert (Hoppe-Tichy, 1997).

Alle Antimykotika verbinden jedoch zwei Nachteile. Einerseits ist die intrakorporale Anwendung bei großflächigen und systemischen Mykosen mit schweren Nebenwirkungen verbunden, da sie leber- und nierenschädigend wirken. Andererseits hat die antimykotische Therapie, vor allem mit Azolderivaten, schon zur Entwicklung resistenter Stämme geführt. Einen Mechanismus stellt hierbei die Amplifikation resistenzvermittelnder Gene dar. Die Fluconazolresistenz eines *C. glabrata*-Isolates konnte z.B. auf eine erhöhte Kopiezahl eines Chromosoms zurückgeführt werden (Marichal *et al.*, 1997). Die erhöhte Inzidenz von Pilzinfektionen wird zwangsläufig auch die Entwicklung von Resistenzen beschleunigen. Es ist daher wichtig, pilzspezifische Komponenten von Stoffwechsel- und Signalwegen auf molekularer Ebene zu charakterisieren, um die Virulenzfaktoren des Pilzes als Grundlage zur Entwicklung neuer antimykotisch wirksamer Substanzen zu entschlüsseln. Da ca. 80 % aller Mykosen durch *Candida* spp. hervorgerufen werden (Pfaller, 1996), konzentriert sich die molekulargenetische Analyse auf den Haupterreger *C. albicans*.

***C. albicans* – Taxonomie und Genetik**

Die humanpathogene Hefe *C. albicans* wurde bislang den Deuteromyceten zugeordnet. Bei den Mitgliedern dieser auch als Fungi imperfecti bezeichneten Gruppe konnte noch kein sexueller Vermehrungszyklus nachgewiesen werden. Diese klassische Einteilung basierte hauptsächlich auf der morphologischen Analyse, der Ploidie und der Art der vegetativen Zellteilung (Knospung, Spaltung).

Neuere Einteilungen hingegen legen den Schwerpunkt auf molekulargenetische Kriterien. Zur phylogenetischen Analyse dienen beispielsweise Sequenzvergleiche ribosomaler RNA bzw. DNA (5S, 18S, 26S). Neben der Sequenzierung weiterer Gene (Cytochrom II Oxidase, β -Tubulin) erlaubt auch die Analyse der mitochondrialen DNA Rückschlüsse auf die verwandtschaftlichen Beziehungen der Hefen (Petersen, 2000).

Die Fungi imperfecti können nach diesen Kriterien den Ascomyceten und Basidiomyceten zugeordnet werden, wobei jedoch aufgrund der sexuellen Fortpflanzung zwischen teleomorphen und anamorphen Genera unterschieden wird. Während *C. neoformans* z.B. den Basidiomyceten zugeordnet werden kann, gelten *C. albicans* und *S. cerevisiae* als Ascomyceten (Petersen, 2000). *S. cerevisiae* wird jedoch, im Gegensatz zu *C. albicans*, aufgrund seiner sexuellen Vermehrung als teleomorph eingestuft. Der namensgebende Ascus enthält bei der Bäckerhefe vier haploide Sporen, die entweder den Paarungstyp a oder α besitzen. Nach der Keimung der Sporen unter geeigneten Umweltbedingungen können haploide Zellen komplementären Paarungstypes durch Fusion („Mating“) den sexuellen Vermehrungszyklus abschließen. Genetisch determiniert wird der Paarungstyp am sogenannten *MAT*-Locus. In *C. albicans* wurden vor kurzem homologe Gene dieses *MAT*-Locus beschrieben (Hull und Johnson, 1999). Neben den homologen regulatorischen Proteinen $\alpha 1$, $\alpha 1$ und $\alpha 2$ werden am heterozygoten *MAT*-Locus von *C. albicans* (auch *MTL*) noch drei weitere Proteine codiert: eine Poly(A)-Polymerase, ein Oxysterol-bindendes Protein und eine Phosphatidylinositolkinase. Die Funktionalität dieses Locus im Hinblick auf eine sexuelle Fortpflanzung konnte bisher nur artifiziell erzeugt werden. Stämme mit einer Deletion entweder im *MTLa*- oder im *MTLa*-Locus wurden nach einer gemeinsamen Inkubation in der Maus mithilfe entsprechender Marker auf eine vollzogene Fusion hin selektiert (Hull *et al.*, 2000). In einem anderen Ansatz wurden durch den Verlust eines Homologs von Chromosom 5 produzierte *MTLa*- und *MTLa*-Stämme auch in Kultur „gekreuzt“ (Magee und Magee, 2000). In beiden Fällen konnte eine erfolgreiche Fusion komplementärer Stämme nachgewiesen werden, da die produzierten Stämme tetraploid waren und sowohl beide *MTL*-Allele als auch die Marker der eingesetzten Deletionsstämme aufwiesen. Zum Beweis eines natürlichen sexuellen Vermehrungszyklus von *C. albicans* fehlt allerdings noch der Nachweis einer meiotischen Zellteilung.

Unabhängig von der sexuellen Rekombination zeigt sich eine ausgeprägte genetische Variabilität. Neben einigen heterozygoten Loci (Whelan und Magee, 1981; Whelan und Soll, 1982) werden auch größere Umordnungen des diploiden Genoms beobachtet (Rutschenko-Bulgac *et al.*, 1990). Diese genetische Instabilität erschwert die molekulargenetische Analyse von *C. albicans*.

Darüberhinaus erweist sich auch der abweichende Kodongebrauch insbesondere bei der Expression heterologer Gene als hinderlich. Da das Kodon CUG in Serin und nicht in Leucin translatiert wird (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995), finden z.B. die Reportergene *lacZ* aus *Escherichia coli* und *GFP* aus *Aequorea victoria* in *C. albicans* keine Anwendung. Mit dem eine β -Galaktosidase codierenden *LAC4*-Gen aus *Kluyveromyces lactis* (Leuker *et al.*, 1992), einer codonoptimierten *GFP*-Version (Cormack *et al.*, 1997) und *RLUC* aus *Renilla reniformis* (Srikantha *et al.*, 1996) stehen zur Expressionanalyse einige Reportergene zur Verfügung. Dieses Repertoire wurde vor kurzem um das *lacZ*-Gen aus *Streptococcus thermophilus* erweitert (Uhl und Johnson, 2001). Diese β -Galaktosidase zeigte im Vergleich mit der von *LAC4* exprimierten eine deutlich höhere Aktivität und eignet sich auch in integrierter Einzelkopie zur Analyse der Reporterexpression.

Heterologe Gene können auch nach Transformation autonom replizierender Plasmide episomal exprimiert werden. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* basieren diese Plasmide nicht auf Centromer- oder 2μ -Sequenzen, sondern auf autonom replizierenden Sequenzen (Kurz *et al.*, 1987; Cannon *et al.*, 1992; Herreros *et al.*, 1992). Die Kopiezahl aller *C. albicans*-Vektoren ist daher variabel. Vor kurzem wurden in *C. albicans* erstmals auch natürliche Plasmide beschrieben (Huber und Rustchenko, 2001). Neben einem großen zirkulären rDNA-Plasmid unbekannter Größe treten lineare rDNA-Plasmide mit einer Größe zwischen 50-150 kb in variabler Kopiezahl auf.

Zur Analyse der Funktion eines Gens wird es häufig auch in definierten Mengen mit Hilfe eines regulierbaren Promotors exprimiert. Der Promotor des *PCK1*-Gens, welches die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase codiert, eignet sich beispielweise zur sehr starken Überexpression eines Gens. Durch Glukose wird die Expression des Schlüsselenzyms der Glukoneogenese und somit auch der *PCK1p* reprimiert, während er durch alternative C-Quellen (z.B. Casaminosäuren) induziert werden kann (Leuker *et al.*, 1997). Die Expression eines essentiellen Gens läßt sich in Fusion mit dem *MET3*-Promotor durch Methionin und Cystein bis zur Letalität minimieren (Care *et al.*, 1999). Der *MAL2*-Promotor (Backen *et al.*, 2000) und ein Tetracyclin-regulierter Promotor (Nakayama *et al.*, 2000) haben die Möglichkeiten der regulierten Genexpression in *C. albicans* erweitert.

Die Transformation von *C. albicans* basiert hauptsächlich auf den Markern *URA3* (Kelly *et al.*, 1987), *ADE2* (Kurtz *et al.*, 1987) und *LEU2* (Kelly *et al.*, 1988), welche auxotrophen Stämmen auf Mangelmedien Wachstum ermöglichen (Fonzi und Irwin, 1993). Der dominante Marker *IMH3* hingegen verleiht prototrophen Stämmen eine Resistenz gegenüber Mycophenolsäure (Beckerman *et al.*, 2001) und eröffnet die Möglichkeit Wildtypstämme bzw. klinische Isolate zu transformieren.

Zur Gendisruption stehen mittlerweile zahlreiche Methoden zur Verfügung. Die klassische „URA-Blaster“-Methode mit FOA-Selektion (Fonzi und Irwin, 1993) wurde ergänzt durch die „URA-Flipper“-Methode, welche zur gezielten Induktion der intrachromosomalen Rekombination eine Rekombinase unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors verwendet (Morschhäuser *et al.*, 1999). Während mit diesen Verfahren das Zielgen in zwei Schritten auf beiden Allelen ausgeschaltet wird, produziert eine andere Methode in nur einem Transformationschritt und anschließender mitotischer Rekombination homozygote Mutanten (Enloe *et al.*, 2000).

Die gerade in der letzten Zeit entwickelten Methoden zur molekulargenetischen Analyse von *C. albicans* haben die Forschung an diesem pathogenen Pilz erheblich vereinfacht und beschleunigt. Das Fundament der weiteren Entwicklung bildet hingegen die vollständige Sequenz des Genoms, auf welche seit dem letzten Jahr freier Zugriff besteht unter: (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>). Anhand eines umfassenden Sequenzvergleichs von über 500 Genen, welche an der sexuellen Differenzierung von *S. cerevisiae* beteiligt sind, mit dem *C. albicans*-Genom konnten zahlreiche Homologe identifiziert werden (Tzung *et al.*, 2001). Nahezu alle Komponenten des Pheromon-Signalweges in *S. cerevisiae* besitzen homologe Gene in *C. albicans*, während zahlreiche an der Meiose beteiligten Gene nur in der Bäckerhefe vorkommen. Im Vergleich mit Meiose-Genen anderer Organismen (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) wurden jedoch einige Homologe in *C. albicans* identifiziert und lassen die Existenz einer natürlichen sexuellen Fortpflanzung möglich erscheinen.

***C. albicans* – Virulenzfaktoren**

Die Virulenz eines Pathogens wird durch zahlreiche Eigenschaften des Erregers bestimmt. Als Kommensale und opportunistischer Pilz besiedelt *C. albicans* mehrere Körperregionen des Menschen. In der Anpassung an die sehr unterschiedlichen Wachstumsbedingungen weist dieser Pilz eine hohe Variabilität auf, wenngleich er es nicht vermag, ein völlig intaktes Immunsystem des Wirtes zu überwinden. Die zuvor beschriebenen Einschränkungen in der Immunabwehr aber auch Mazerationen der Haut ermöglichen *C. albicans* eine lokale oder systemische Infektion. In der Reihenfolge, in der die Virulenzfaktoren dabei wirksam werden, sollen sie vorgestellt werden.

Der Adhäsion des Pilzes an die Epithelien des Wirtes folgt die Invasion des Gewebes. Eine systemische Infektion zeichnet sich darüberhinaus durch die Ausbreitung von *C. albicans* im gesamten Organismus aus. Die bei vielen Pathogenen beschriebene Immunevasion durch Antigenvariation stellt auch einen Virulenzfaktor dieses opportunistischen Erregers dar (Abb.1).

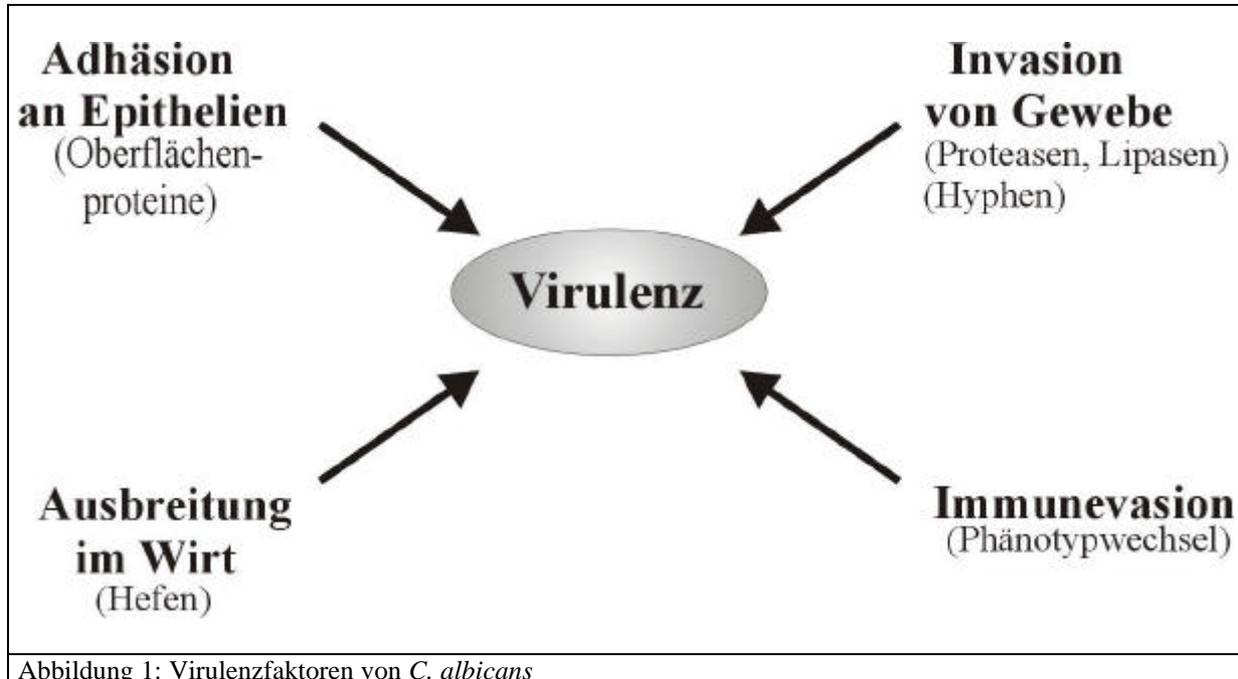


Abbildung 1: Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Die Adhäsion von *C. albicans* an die Mukosa des Wirtes wird durch Proteine, die auf der Zelloberfläche des Pilzes exprimiert werden, gewährleistet. Diese als Adhäsine bezeichneten Polypeptide sind in der Lage an Proteine der extrazellulären Matrix der Säugerzelle, wie z.B. Fibronectin, Laminin, Fibrinogen und Kollagen Typ I und IV zu binden (Hostetter, 1994; Sturtevant und Calderone, 1997; Chaffin *et al.*, 1998). Eine solche Funktion wird z.B. durch die beiden Proteine Als1p und Als5p vermittelt (Fu *et al.*, 1998). Die insgesamt sieben Als-Proteine zeigen typische Merkmale sekretierter Proteine und werden wahrscheinlich über den Rest eines GPI-Ankers am C-Terminus auf der Zelloberfläche verankert (Hoyer, 2001). Der Aminoterminus scheint die Bindung an die Proteine der Wirtszellen zu vermitteln. Ein weiteres Adhäsine stellt das strukturell sehr ähnliche Protein Hwp1p dar (Staab *et al.*, 1999). Dieses Mannoprotein präsentiert ebenfalls seinen Aminoterminus auf der Zelloberfläche, während der Carboxyterminus kovalent mit der Zellwand verbunden ist. Das Integrin-ähnliche Protein Int1p kann ebenfalls der Klasse der Adhäsine zugeordnet werden. Die Deletion dieses Oberflächenproteins beeinträchtigt die Adhäsionsfähigkeit an humane Epithelzellen und verursacht einen nahezu vollständigen Verlust der Virulenz (Gale *et al.*, 1998).

Der Glykosylierungsstatus dieser Adhäsine scheint an ihrer Funktion ebenfalls beteiligt zu sein, da Deletionen der Mannosyltransferasen Mnt1p und Pmt1p sowohl eine verminderte Adhäsion als auch eine drastisch reduzierte Virulenz zeigen (Buurman *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 1998). Wenngleich ihre Funktion nur indirekt die Pathogenität von *C. albicans* beeinflusst, können sie als Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Während die Funktion der Adhäsine auch für die Rolle von *C. albicans* als Kommensale von Bedeutung ist, markiert die Invasion des Wirtsgewebes den Übergang zur Rolle als Pathogen.

Der Fähigkeit zum filamentösen Wachstum in Form von Hyphen und Pseudohyphen kommt dabei neben der Sekretion proteolytischer und lipolytischer Enzyme eine entscheidende Bedeutung zu. Der Vergleich mit anderen Pilzen zeigt jedoch, daß die Bildung von Filamenten alleine nicht ausreicht, um die Rolle als Pathogen zu definieren.

Obwohl *S. cerevisiae* die Fähigkeit zur Pseudohyphenbildung besitzt (Gimeno *et al.*, 1992), gilt die Bäckerhefe nicht als Krankheitserreger. Allerdings konnte z.B. bei den pathogenen Hefen *C. glabrata* und *C. neoformans* filamentöses Wachstum nachgewiesen werden, obwohl sie lange Zeit als afilamentös galten (Csank und Haynes, 2000; Wickes *et al.*, 1996). Die Fähigkeit zum reversiblen Wechsel zwischen einzelligem und filamentösem Wachstum (Dimorphismus) begründet ebenfalls nicht die Pathogenität, da auch reine Myzelbildner wie *A. fumigatus* gefährliche Krankheitserreger darstellen (Odds, 1988). Der Dimorphismus von *C. albicans* scheint hingegen in erheblichem Umfang zur Pathogenität dieses Pilzes beizutragen, da klinische Isolate in der Regel sowohl Blastosporen als auch Filamente enthalten. Hyphen sind beispielsweise in der Lage, Epithelien zu durchwachsen (Pendrak und Klotz, 1995; Weide und Ernst, 1999) und so zur Gewebeinvasion beizutragen. Nach Eintritt in die Blutbahn eignet sich die Hefeform von *C. albicans* optimal zur Verbreitung im gesamten Organismus (Cutler, 1991). Diese „Überschwemmung“ des Wirtes erfolgt jedoch nur im Zuge einer systemischen Infektion bei einem völligen Zusammenbruch des Immunsystems, z.B. bei AIDS-Patienten im Endstadium. Der Dimorphismus erweist sich jedoch auch in der Reaktion auf die zelluläre Immunantwort als vorteilhaft, da phagozytierte Blastosporen in Form von Hyphen aus Makrophagen herauszuwachsen vermögen (Arai *et al.*, 1977; Vasquez-Torres und Balish, 1997). Die molekularen Mechanismen der Regulation des Dimorphismus werden im folgenden Kapitel detailliert vorgestellt.

Als weitere Virulenzfaktoren, die zur Invasion beitragen, werden sekretierte Proteasen, (Phospho)Lipasen und N-Acetyl-Glukoaminidasen angesehen (Hube *et al.*, 1997; Ghannoum *et al.*, 2000; Hube *et al.*, 2000, Molloy *et al.*, 1994). Von den beschriebenen Phospholipasen PLA, PLB, PLC und PLD konnte bisher nur für *PLB1* ein Zusammenhang zur Virulenz von *C. albicans* hergestellt werden (Ghannoum *et al.*, 2000). Die sauren Aspartatproteasen (SAP) bilden ebenso wie die Lipasen (LIP) eine zehn Mitglieder umfassende Genfamilie. Die Bedeutung für die Virulenz wurde durch die Deletion einiger *SAP*-Gene nachgewiesen (Hube *et al.*, 1997). Ebenso wie die *LIP*-Gene unterliegen die *SAP*-Gene einer komplexen differentiellen Expression. Die Expression einiger *SAP*-Gene wird beispielweise in Anpassung an die verschiedenen Habitate von *C. albicans* durch den pH-Wert reguliert. Darüberhinaus werden im zeitlichen Verlauf der Gewebeinvasion unterschiedliche *SAP*-Gene exprimiert (Schaller *et al.*, 2000). Der frühen Phase der Invasion mit der Expression von *SAP1* und *SAP2* schließt sich die Expression von *SAP8* an. Während der abschließenden intensiven Hyphenbildung wird ausschließlich *SAP6* exprimiert. Die große Zahl der Proteasen und Lipasen codierenden Gene und insbesondere ihre differentielle Expression verleiht *C. albicans* im Hinblick auf die Invasion verschiedener Wirtsgewebe eine enorme Flexibilität, welche durch den reversiblen Wechsel zwischen Blastosporen und Filamenten zusätzlich erhöht wird.

Neben dem Dimorphismus wurde in *C. albicans* noch das Phänomen eines spontanen Phänotypwechsels („phenotypic switching“) beschrieben. In Stamm 3153A treten beispielsweise bis zu fünf verschiedene Koloniefornen auf („star“; „stippled“; „hat“; „irregular wrinkle“; „fuzzy“). Da sich jeder Kolonietyp spontan in einen anderen umwandeln kann und auch Mischformen beobachtet werden, ist die experimentelle Analyse dieses komplexen Phänotypwechsel nahezu unmöglich (Slutsky *et al.*, 1985). Der Phasenwechsel des Stammes WO-1 wurde hingegen eingehend charakterisiert (Slutsky *et al.*, 1987; Soll, 1997). Er ist lediglich durch zwei verschiedene Phänotypen gekennzeichnet. Während die „white“-Form dieses Stammes eine normale Kolonieforn und runde bis ovale Zellen

aufweist, bildet die „opaque“-Form flache gräuliche Kolonien und elongierte stäbchenförmige Zellen. Die Ultrastruktur von „opaque“-Zellen zeigt außerdem noch charakteristische als „pimple“ bezeichnete Ausstülpungen (Anderson *et al.*, 1990). Der „white“-Phänotyp kann bei 30°C kultiviert werden, wohingegen der „opaque“-Phänotyp nur bei 25°C relativ stabil ist (Bergen *et al.*, 1990). In beide Richtungen findet auch unter diesen Bedingungen ein spontaner Wechsel des Phänotyps statt, wobei der Wechsel von „opaque“ zu „white“ deutlich häufiger (10^{-1} - 10^{-3}) beobachtet wird als umgekehrt (10^{-3} - 10^{-5}). Experimentell kann durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C eine Massenkonzersion vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp induziert werden.

Neben diesen morphologischen Merkmalen unterscheiden sich beide Phasen z.B. auch hinsichtlich der Adhäsion (Kennedy *et al.*, 1988), des Sterol-/Lipidgehaltes (Ghannoum *et al.*, 1990) und der Sensitivität gegenüber Antimykotika (Soll *et al.*, 1991). Darüberhinaus vermögen lediglich „white“-Zellen unter Standardbedingungen Hyphen zu bilden, „opaque“-Zellen zeigen nur auf humanen Epithelzellen filamentöses Wachstum (Anderson *et al.*, 1989). Reguliert werden die Charakteristika beider Phänotypen durch ein komplexes System differentieller Genexpression. Als „opaque“-spezifische Gene wurden *SAP1*, *SAP3*, *OP4* und *CDR3* beschrieben (Morrow *et al.*, 1992; Hube *et al.*, 1994; Morrow *et al.*, 1994; Balan *et al.*, 1997), als „white“-spezifisch *SAP2* und *WH11* (Srikantha und Soll, 1993).

In die Regulation des Phänotypwechsels auf molekularer Ebene scheinen die beiden Histon-Deacetylasen Hda1p und Rpd3 involviert zu sein. Die Deletion von *HDA1* forciert den Wechsel von „white“ zu „opaque“, während die Deletion von *RPD3* die Wechselrate in beide Richtungen erhöht (Srikantha *et al.*, 2001). Demgegenüber besitzt auch der Transkriptionsfaktor Efg1p, der im Mittelpunkt dieser Arbeit steht und daher noch detailliert vorgestellt wird, eine regulatorische Funktion im Phänotypwechsel des Stammes WO-1. Neben seiner phasenspezifischen Expression im „white“-Phänotyp verursacht die Überexpression von *EFG1* einen Wechsel vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp (Sonneborn *et al.*, 1999b).

Die Bedeutung dieses Phasenwechsels für die Virulenz von *C. albicans* zeigt sich an einer erhöhten Wechselrate in frischen klinischen Isolaten (Soll, 1988; Jones *et al.*, 1994). Darüberhinaus konnten „opaque“-Zellen in einem Modell die menschliche Haut besser besiedeln, während „white“-Zellen im Maus-Modell der systemischen Infektion eine höhere Virulenz zeigen (Kvaal *et al.*, 1999). Diese Spezialisierung der Phänotypen auf verschiedene Infektionswege unterstreicht ihre Funktion in der Pathogenese.

Zusätzlich bietet ein Phänotypwechsel die Möglichkeit der Antigenvariation zur Umgehung des Immunsystems. Bei anderen Pathogenen wie z.B. *Trypanosoma brucei*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Salmonella typhimurium* ist diese Funktion mit der Expression zahlreicher antigener Varianten allerdings deutlich stärker ausgeprägt als im Stamm WO-1 mit dem Wechsel zwischen lediglich zwei Phänotypen (Donelson, 1989; Swanson und Koomey, 1989; Glasgow *et al.*, 1989).

C. albicans verfügt somit über ein großes Repertoire potentieller Virulenzfaktoren, die in einem komplexen Zusammenspiel zur Pathogenität dieses opportunistischen Pilzes beitragen. In Anpassung an die sehr verschiedenen Habitate des Kommensalen und die unterschiedlichen Infektionswege des Erregers verleiht ein flexibles System differentieller Genexpression *C. albicans* diese große Variabilität.

***C. albicans* – Dimorphismus**

Die Pathogenität von *C. albicans* basiert nicht ausschließlich auf dem Dimorphismus dieses Pilzes. In Kombination mit den zuvor beschriebenen Virulenzfaktoren wird ihm jedoch eine Schlüsselrolle zugeordnet. In *C. albicans* beschreibt er nicht nur die zwei morphologischen Wachstumsformen Hefe und Hyphe, sondern den Wechsel zwischen einzelligem und mehrzelligem filamentösem Wachstum im allgemeinen. Einzelliges Wachstum manifestiert sich einerseits in der typischen Hefezellform (Blastosporen), andererseits in Chlamydosporen. Filamente werden sowohl in Form von echten Hyphen als auch Pseudohyphen gebildet (Abb. 2).

Die Vermehrung der Blastosporen erfolgt durch Knospung, wohingegen die dickwandigen runden Chlamydosporen von pseudohyphalen Helferzellen gebildet werden (Montazeri und Hedrick, 1984; Joshi *et al.*, 1993).

Während ausdifferenzierte echte Hyphen und Pseudohyphen sich nur schwer unterscheiden lassen, weist ihre Genese charakteristische Merkmale auf.

Echte Hyphen entstehen durch das kontinuierliche apikale Wachstum eines Keimschlauches, der anschließend septiert wird. Pseudohyphen werden durch unipolare Knospung gebildet, wobei die elongierten Tochterzellen den Kontakt zur Mutterzelle aufrechterhalten und auf diese Weise Filamente bilden. Beide filamentösen Formen sind in der Lage durch Knospung wieder Blastosporen zu bilden.

Zur experimentellen Induktion filamentösen Wachstums stehen neben positiven Induktoren auch spezielle Mangelmedien zur Verfügung. Den stärksten Induktor echter Hyphen stellt Serum in einer Konzentration von 5-20% dar (Odds, 1988). Auch N-Acetylglukosamin, Prolin und cAMP vermögen Hyphenwachstum zu induzieren (Cassone *et al.*, 1985; Land *et al.*, 1975; Niimi *et al.*, 1980, Sabie und Gadd, 1992; Niimi *et al.*, 1996). Neben diesen Medienzusätzen begünstigt eine Temperaturerhöhung (37°C) und ein neutraler pH-Wert die Entwicklung echter Hyphen (Buffo *et al.*, 1984). Die Effizienz der Hypheninduktion kann durch eine vorangehende Hungerphase gesteigert werden (Holmes und Shepherd, 1988; Delbrück und Ernst, 1993). Nährstoffmangel führt auch als Einzelfaktor zur Hyphenbildung. Sowohl Stickstoffmangel (SLAD) als auch ein Medium mit komplexer Stickstoffquelle und Mannitol als Kohlenstoffquelle (Spider- und modifiziertes Lee-Medium) induzieren filamentöses Wachstum in *C. albicans* (Csank *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994). Die Limitierung von Sauerstoff forciert ebenfalls die Entwicklung echter Hyphen (Riggle *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 1999a).

Nahezu alle Induktionsprotokolle erinnern an die natürlichen Wachstumsbedingungen dieses Pilzes in seinem Wirt oder sind aus diesen abgeleitet worden. Verschiedene Charakteristika der von *C. albicans* besiedelten Epi- und Endothelien des Menschen führen sowohl über positive Induktoren als auch über Mangelbedingungen zur Entwicklung filamentösen Wachstums. Die Umweltreize werden in einem komplexen System verschiedener Signaltransduktionskaskaden integriert und in die optimale Wachstumsform des Pilzes umgesetzt. Diese sollen mit Konzentration auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren im folgenden vorgestellt werden (Abb. 3).

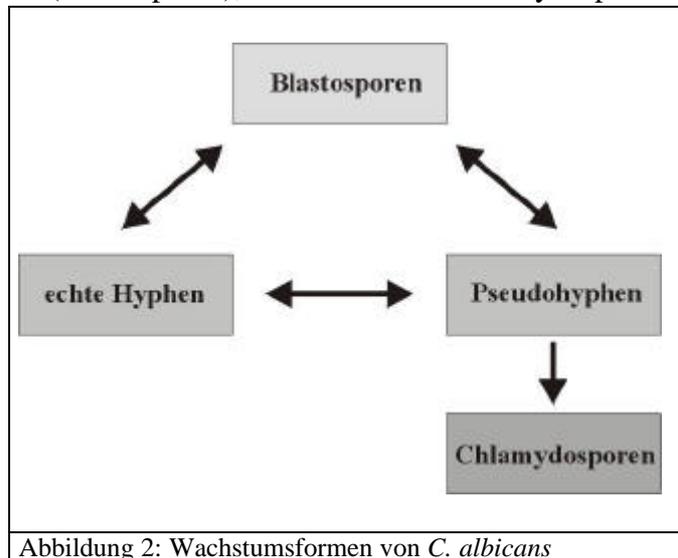
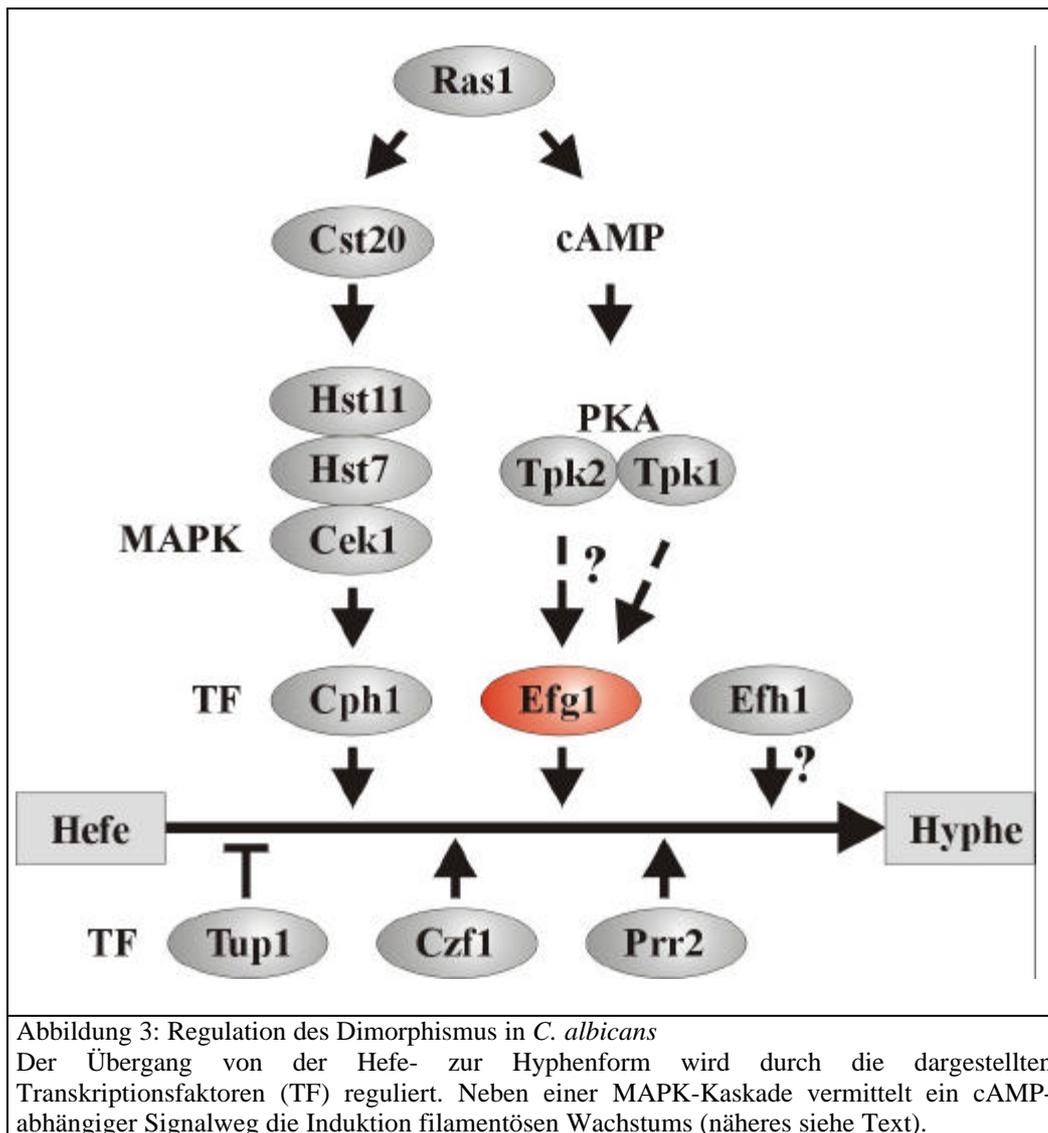


Abbildung 2: Wachstumsformen von *C. albicans*



In *C. albicans* wurden zahlreiche an der Regulation der Morphogenese beteiligte Faktoren identifiziert. Ihre funktionellen Zusammenhänge sind mit Ausnahme zweier Signalwege weitgehend unbekannt. Parallel zu einer MAPK-Kaskade wird die Hyphenbildung durch einen cAMP-abhängigen Signalweg reguliert.

Die Grundlage zur Identifizierung dieser beiden Wege bildete ihre große Homologie zur Signaltransduktion in *S. cerevisiae*. Der MAPK-Weg steuert in *S. cerevisiae* neben der Pseudohyphenbildung auch die Pheromonantwort (Liu *et al.*, 1993; Madhani und Fink, 1997). Auch der cAMP-abhängige PKA-Weg besitzt in *S. cerevisiae* neben der Regulation des filamentösen Wachstums zahlreiche weitere Funktionen (Robertson und Fink, 1998). Die Proteinkinase A ist sowohl in die Regulation der Antwort auf osmotischen, oxidativen und temperaturbedingten Stress (Norbeck und Blomberg, 2000; Charizanis *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998), als auch in den Wechsel von fermentierbaren zu nicht-fermentierbaren C-Quellen involviert (Jiang *et al.*, 1998). Auch die Eisenaufnahme und der Abbau von Reservekohlenhydraten werden über die PKA gesteuert (Robertson *et al.*, 2000).

In Homologie zu *C. albicans* führt Stickstoffmangel in *S. cerevisiae* ebenfalls zu filamentösem Wachstum, allerdings nur in Form von Pseudohyphen (Gimeno *et al.*, 1992). In der Signaltransduktion werden die homologen Kinasen Ste20p (Cst20p), Ste11p (Hst11p; im Genom identifiziert aber noch nicht näher beschrieben), Ste7p (Hst7p) und Kss1p (Cek1p) durch aufeinanderfolgende Phosphorylierungen aktiviert (Liu *et al.*, 1993).

Am Ende dieser signalverstärkenden Kaskade führt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Ste12p (Cph1p) zur Aktivierung der Zielgene. Die Spezifität dieses Signalweges, der in *S. cerevisiae* sowohl die Pseudohyphenbildung als auch die Pheromonantwort steuert, wird auf Ebene der MAP-Kinasen sowie des Transkriptionsfaktors reguliert. In der Pseudohypheninduktion wird die MAP-Kinase Kss1p, in der Pheromonantwort die MAPK Fus3p aktiviert (Madhani *et al.*, 1997). Zusätzlich führt die Dimerisierung von Ste12p mit Tec1p zur Bindung von „filamentous growth responsive elements“ (FRE) in den Promotoren der Zielgene, während die Dimerisierung von Ste12p mit Mcm1p über die Bindung von „pheromone responsive elements“ (PRE) die Pheromonantwort vermittelt. Die funktionelle Homologie bzw. die Reihenfolge im Signalweg der *C. albicans*-Homologen konnte mit epistatischen Versuchen nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1994; Köhler und Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Csank *et al.*, 1998).

Obgleich *S. cerevisiae* und *C. albicans* eine große Homologie in dieser MAPK-Kaskade aufweisen, so unterscheiden sich die Signalwege im Hinblick auf ihre Bedeutung für das filamentöse Wachstum der beiden Hefen erheblich. Während die Pseudohyphenbildung von *S. cerevisiae* durch die Deletion von Komponenten der MAPK-Kaskade nahezu vollständig inhibiert wird, zeigt *C. albicans* nach Mutation der Homologen sowohl hinsichtlich der Hyphenbildung als auch der Virulenz nur partielle Defekte (Köhler und Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997). Insbesondere ist im Vergleich mit *S. cerevisiae* die Bedeutung des durch den MAP-Kinaseweg regulierten Transkriptionsfaktors Cph1p für die Hyphenbildung von *C. albicans* geringer einzuschätzen. Die Schlüsselrolle in der Regulation filamentösen Wachstums spielt der Transkriptionsfaktor Efg1p (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000a, b). Die Deletion von *EFG1* blockiert nahezu vollständig die Hyphenbildung unter allen Standardinduktionsprotokollen, während die zusätzliche Deletion von *CPHI* diesen Phänotyp, auch in einer *efg1/tup1*-Mutante (Braun und Johnson, 2000), kaum zu steigern vermag. Den kompletten Verlust der Virulenz im Mausmodell der systemischen Infektion zeigt jedoch nur die *efg1/cph1*-Doppeldelation (Lo *et al.*, 1997). Allerdings wurde auch in dieser Mutante unter speziellen Bedingungen filamentöses Wachstum beobachtet (Brown *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 1999a). Sowohl die Einbettung in Agar als auch mikroaerophile Bedingungen (Sauerstoffmangel) führen zur Ausbildung echter Hyphen (Brown *et al.*, 1999; Riggle *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 1999a). Vermittelt wird die Filamentbildung unter diesen Bedingungen durch den Transkriptionsfaktor Czflp (Abb. 3). Während eine *czfl*-Mutante in Einbettung weniger Hyphen bildet, stimuliert die Überexpression von *CZF1* die Bildung echter Hyphen (Brown *et al.*, 1999). Da die zusätzliche Deletion von *CPHI* den Phänotyp von *czfl* noch steigert, scheint Cph1p an der Hypheninduktion unter diesen Bedingungen aktivierend beteiligt zu sein. Für Efg1p wird hingegen eine inhibierende Funktion diskutiert, da eine *efg1*-Mutante bei Sauerstoffmangel sogar ein gegenüber dem Wildtyp verstärktes Hyphenwachstum zeigt (Sonneborn *et al.*, 1999a).

Der zuvor beschriebene Einfluß des pH-Wertes auf den Dimorphismus wird über den Transkriptionsfaktor Prr2p reguliert (Ramon *et al.*, 1999). Dieser unterliegt seinerseits einer Aktivierung durch Prr1p (Porta *et al.*, 1999). Eine *prr2*-Mutante zeigt bei leichter Induktion ein vermindertes Hyphenwachstum und ist nicht in der Lage, die Expression der pH-regulierten Gene *PHR1* und *PHR2* zu steuern (Fonzi, 1999).

Während alle zuvor beschriebenen Transkriptionsfaktoren den Übergang von der Hefe- zur Hyphenform aktivieren, besitzt der Transkriptionsfaktor Tup1p eine antagonistische reprimierende Funktion, da ein *tup1*-Deletionsstamm konstitutiv filamentöses Wachstum zeigt (Braun und Johnson, 1997). Dabei handelt es sich jedoch hauptsächlich um Pseudohyphen. Da in der *tup1*-Mutante durch Serum jedoch keine echten Hyphen induziert werden können (Braun und Johnson, 1997), scheint Tup1p neben seiner Rolle als Repressor von Pseudohyphen auch in der Ausbildung echter Hyphen regulatorisch beteiligt zu sein.

Ein indirekter Einfluß auf den Dimorphismus kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da dieser Transkriptionsfaktor analog zu seiner Rolle in *S. cerevisiae* als Regulator von über 100 Genen (Glukose-Regulation, oxidative Streßantwort, DNA-Reparatur) auch in *C. albicans* an der hitzebedingten Streßantwort und der Integrität der Zellwand beteiligt ist. Daß jedoch der starke filamentöse Phänotyp der *tup1*-Mutante z.T. durch die zusätzliche *efg1*-Deletion (aber nicht durch *cph1*) wieder aufgehoben werden konnte (Braun und Johnson, 2000), unterstreicht die Schlüsselfunktion von Efg1p im Dimorphismus von *C. albicans*.

Der cAMP-abhängige Signalweg, in dem Efg1p diese Funktion ausübt (Abb. 3), weist ebenso wie der MAP-Kinaseweg große Homologien zu *S. cerevisiae* auf. Während in der Bäckerhefe das kleine G-Protein Ras2p beide Signalwege reguliert (Lorenz und Heitman, 1997; Robertson und Fink, 1998), wird seine Funktion in *C. albicans* von dem homologen Protein Ras1p übernommen (Feng *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae* wird die MAPK-Kaskade von Ras2p über Cdc42p aktiviert (Mösch *et al.*, 1996), wohingegen der PKA-Weg von Ras2p über die Aktivierung der Adenylylzyklase Cyr1p und die damit verbundene Erhöhung des cAMP-Spiegels angeschaltet wird. Das dominant aktive Ras2^{Val19}-Allel forciert die Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* (Gimeno *et al.*, 1992). In *C. albicans* blockiert die Deletion von *RAS1* die Bildung echter Hyphen, während die Entwicklung von Pseudohyphen nicht beeinträchtigt wird (Feng *et al.*, 1999). Ein dominant aktives Allel verstärkt hier die Induktion echter Hyphen. Für Ras1p wird daher auch in *C. albicans* eine aktivierende Funktion sowohl des MAP-Kinaseweges über Cst20p (Abb. 3) als auch des PKA-Weges über den cAMP-Spiegel diskutiert (Ernst, 2000b).

Die im Zentrum des cAMP-abhängigen Weges stehende Proteinkinase A besitzt in *S. cerevisiae* drei isoforme katalytische Untereinheiten (Tpk1p, Tpk2p, Tpk3p), wobei Tpk2p eine aktivierende und Tpk1p/Tpk3p eine inhibierende Funktion in der Pseudohyphenbildung zukommt (Robertson und Fink, 1998; Pan und Heitman, 1999). In *C. albicans* wurden bisher nur die beiden Isoformen Tpk1p und Tpk2p beschrieben (Bockmühl, 2001; Sonneborn *et al.*, 2000). Die Deletion von *TPK1* wie *TPK2* führt unter schwachen Induktionsbedingungen zu Defekten in der Entwicklung echter Hyphen. Beide Isoformen scheinen ihre Funktion gegenseitig komplementieren zu können, da nur eine konditionale *tpk1/tpk2*-Doppelmutante auch unter starken Induktionsbedingungen (Serum) völlig a-filamentös wächst (Bockmühl, 2001). Allerdings vermittelt Tpk1p hauptsächlich Hyphenwachstum auf festen Medien, wohingegen Tpk2p dies in erster Linie in Flüssigmedien vermag. Darüberhinaus wird als Tpk2p-Funktion die Initialisierung des Keimschlauches, als Tpk1p-Funktion die sich anschließende Aufrechterhaltung des Hyphenwachstums diskutiert (Bockmühl, 2001).

Im Zusammenhang mit der Regulation filamentösen Wachstums wird Sfl1p in *S. cerevisiae* als potentiell Zielprotein für Tpk2p diskutiert. Als Transkriptionsfaktor reguliert Sfl1p die Expression des für die Pseudohyphenentwicklung essentiellen Zellwandproteins Flo11p (Robertson und Fink, 1998; Lo und Dranginis, 1998).

In *C. albicans* wird hingegen der zentrale Regulator des Dimorphismus Efg1p als Zielprotein von PKA im cAMP-abhängigen Signalweg angesehen (Abb. 3). Einerseits deuten epistatische Untersuchungen auf die Position von Efg1p unterhalb von PKA im gleichen Signalweg hin (Sonneborn *et al.*, 2000; Bockmühl, 2001). Andererseits besitzt Efg1p eine potentielle PKA-Phosphorylierungssequenz (RVT) an Position 204-206 (Kenelly und Krebs, 1991). Die Simulation einer nicht-phosphorylierten Aminosäure durch einen Threonin/Alanin-Austausch zerstört die Funktionalität von Efg1p in der Hypheninduktion, während ein Threonin/Glutamat-Austausch, der eine konstitutiv phosphorylierte Aminosäure vortauscht, die Hypheninduktion deutlich verstärkt und ebenfalls die Hyphendefekte von *tpk*-mutanten komplementiert (Bockmühl und Ernst, 2001; Bockmühl, 2001). Die multiplen Funktionen von Efg1p in der Morphogenese von *C. albicans* scheinen jedoch durch zusätzliche Phosphorylierungen und Modifikationen reguliert zu werden (Bockmühl, 2001).

C. *albicans* – Transkriptionsfaktor Efg1p

Neben der Bildung von Filamenten in Form von echten Hyphen und Pseudohyphen steuert Efg1p sowohl die Entwicklung von Chlamydosporen als auch einen Phänotypwechsel von *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999a, b). Aufgrund seiner Struktur gilt Efg1p als Mitglied der APSES-Proteinfamilie (Abb. 4). Im Bereich der ca. 100 Aminosäuren umfassenden APSES-Domäne weisen diese Proteine, als Regulatoren

morphogenetischer Prozesse in verschiedenen Pilzen, eine 80-90%ige Homologie auf. Asm1p reguliert die Reifung der Ascosporen in *Neurospora crassa* (Aramayo *et al.*, 1996), während StuA die Bildung von Konidiophoren in *Aspergillus nidulans* steuert (Miller *et al.*, 1992). *S. cerevisiae* ist mit zwei Mitgliedern in dieser Gruppe vertreten. Phd1 und Sok2 sind in antagonistischer Weise in die Pseudohyphenbildung der Bäckerhefe involviert. Überexpression von *PHD1* sowie Deletion von *SOK2* verstärken das filamentöse Wachstum, so daß Phd1p als Aktivator und Sok2p als Repressor von Pseudohyphen gelten (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995). Efg1p komplettierte diese Gruppe bis vor kurzem. Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *C. albicans* ermöglichte jedoch die

Identifizierung eines weiteren APSES-Proteins. Efh1p (Efg1p Homolog) besitzt ebenfalls eine APSES-Domäne und ist in die Steuerung morphogenetischer Prozesse involviert, da seine Überexpression zu einem pseudohyphalen Phänotyp führt (Bockmühl, 2001).

C. albicans ist somit wie *S. cerevisiae* mit zwei Mitgliedern in dieser Proteinfamilie vertreten.

Eine basische Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH) bildet ein weiteres Charakteristikum dieser Transkriptionsfaktoren. Eine solche Domäne kennzeichnet auch viele Transkriptionsfaktoren aus Säugern (z.B. c-Myc, c-Max, MyoD, E47), Hefen (z.B. Cbf1p, Ino2p/Ino4p, Pho4p) und anderen Eukaryonten (Ferre-d'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994; Cai und Davis, 1990; Berben *et al.*, 1990; Robinson und Lopes, 2000; Ledent und Vervoort, 2001). Sowohl Proliferations- als auch Differenzierungsprozesse von Zellen werden maßgeblich von ihnen reguliert (Jan und Jan, 1993; Hassan und Bellen, 2000).

Die DNA-Bindung von bHLH-Proteinen an als E-Boxen bezeichnete palindromische Erkennungssequenzen (5'-CACGTG-3'; 5'-CAGCTG-3') wird durch die basische Region vermittelt (Murre *et al.*, 1989; Ellenberger *et al.*, 1994), während die HLH-Domäne über die Interaktion amphipathischer Helices zur Bildung von Homo- und Heterodimeren führt (Ma *et al.*, 1994). Insbesondere durch die Heterodimerisierung verschiedener bHLH-Proteine kann die Affinität für unterschiedliche Zielsequenzen moduliert und somit die Variabilität der Transkriptionsregulation erhöht werden (Swanson *et al.*, 1995; Meroni *et al.*, 1997; Walhout *et al.*, 1997). Neben E-Boxen wurden daher eine Vielzahl von Erkennungssequenzen von bHLH-Transkriptionsfaktoren beschrieben (Robinson und Lopes, 2000; Ledent und Vervoort, 2001).

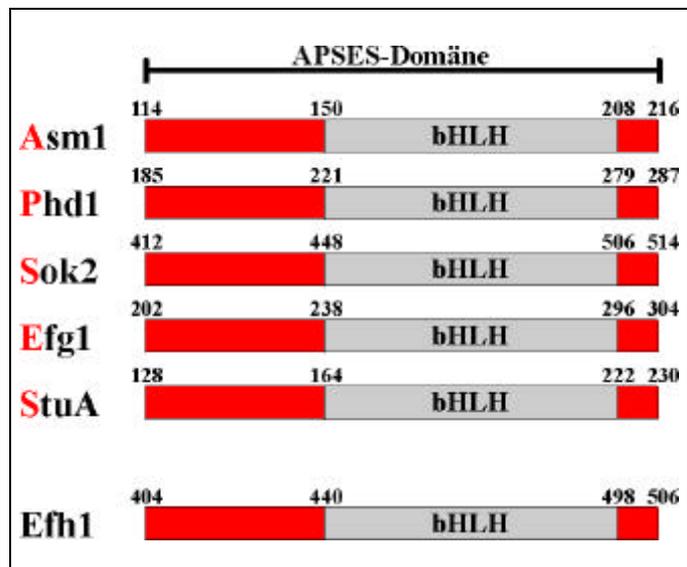


Abbildung 4: Strukturvergleich der APSES-Proteine
Die Homologie von bis zu 90% erstreckt sich über die bHLH-Domäne hinaus über einen Bereich von 102 Aminosäuren (Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren im Protein an). Efh1p aus *C. albicans* kann in diese Gruppe eingeordnet werden.

Während für die APSES-Proteine noch keine Dimerisierungspartner beschrieben wurden, deuten Untersuchungen im Zwei-Hybridmodell in *S. cerevisiae* auf eine Homodimerisierung von Efh1p (Bockmühl, 2001). Desweiteren wurde für Efg1p die für bHLH-Proteine charakteristische Bindung einer E-Box-Erkennungssequenz nachgewiesen (Leng *et al.*, 2001). Alle Mitglieder der APSES-Familie, inklusive Efh1p, weisen sowohl N- als auch C-terminal für Transkriptionsfaktoren typische glutaminreiche Regionen auf. Außerhalb der APSES-Domäne differieren Efg1p und Efh1p ansonsten jedoch erheblich (Bockmühl, 2001). Sie unterscheiden sich nicht nur in der relativen Lage der APSES-Domäne (Efg1p: AS 202-304; Efh1p: AS 412-514) innerhalb des Proteins, sondern auch in ihrer absoluten Größe (Efg1p: 552 AS; Efh1p: 720 AS). Das berechnete Molekulargewicht von Efg1p beträgt 61 kDa und konnte allerdings nur bei heterologer Expression in *E. coli* mittels einer 6xHis-Fusion bestätigt werden (Doedt, 2000). Sowohl bei der heterologen Expression in *S. cerevisiae* als in *C. albicans* wird eine Dreifachbande bei ca. 90 kDa detektiert, die auf posttranslationale Modifikationen zurückgeführt wird (Sonneborn, 1999; Bockmühl, 2001).

Der vergleichbare Überexpressionsphänotyp von Efg1p und Efh1p (Pseudohyphen) kann jedoch nicht auf die homologe APSES-Domäne zurückgeführt werden, da die beiden APSES-Proteine von *S. cerevisiae* antagonistisch als Aktivator (Phd1p) und als Repressor (Sok2p) die Pseudohyphenbildung beeinflussen (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995). Darüberhinaus fungiert Sok2p in *S. cerevisiae* über die Proteinkinase A-Regulation sowohl als Aktivator der Mitose, als auch als Repressor der Meiose (Shenhar und Kassir, 2001). Da die Repressorfunktion in *sok2*-Mutanten heterolog durch Efg1p komplementiert wird, scheinen Sok2p und Efg1p in dieser Hinsicht funktionelle Homologe zu sein. Diese Homologie bezüglich einer Funktion von Efg1p als Aktivator und Repressor offenbart sich in *C. albicans*, da noch keine Meiose beschrieben wurde, in der Regulation der Morphogenese. Filamentöses Wachstum in Form von Hyphen und Pseudohyphen wird von Efg1p sowohl reprimiert als auch aktiviert, wobei die Rolle von Efg1p durch morphogenetisch relevante Umweltreize determiniert wird (Ernst, 2000b).

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Diskrepanz zwischen der Größe des offenen Leserahmens (1,6 kb) und der Größe des Haupttranskriptes (3,2 kb) des *EFG1*-Gens. Die Promotoranalysen von Weide (1998) basierten auf der Bestimmung eines Transkriptionsstartpunktes (-35) in unmittelbarer Nähe des Translationstarts (Stoldt, 1995). Die implizierte Hypothese einer 1,6 kb großen 3'-untranslatierten Region des *EFG1*-Transkriptes konnte am Beginn dieser Arbeit widerlegt werden und definierte gleichzeitig die weiteren Ziele:

Der Northern-Analyse der *EFG1*-Expression folgte die Kartierung der *EFG1*-Transkripte und die Sequenzierung des *EFG1*-Hauptpromotors. Die Funktion der 5'UTR des *EFG1*-Haupttranskriptes wurde sowohl durch Deletion als auch durch Überexpression untersucht.

Mittels Reporterengenfusionen und Transkriptanalysen wurde die Regulation der *EFG1*-Expression in den von Efg1p gesteuerten Entwicklungsprozessen (Hyphenbildung, Phänotypwechsel) analysiert. In einer Deletionsanalyse erfolgte die Identifizierung funktioneller Regionen des Hauptpromotors im Prozeß der negativen Autoregulation von *EFG1*.

Transkriptionelle Wechselwirkungen zwischen *EFG1* und Komponenten des cAMP-Weges (*TPK1/TPK2*) wurden einerseits in Überexpressionsexperimenten, andererseits in *efg1*- und *tpk1/tpk2*-Mutanten analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Braunschweig), Biorad (München), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Calbiochem (Bad Soden), Dianova (Hamburg), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Kodak (New Haven), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Oxoid (Wesel), Pharmacia (Freiburg), Promega (Madison), Qiagen (Hilden), Riedel-De Haen (Hannover), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Tropix (Heidelberg), United States Biochemical Corporation USB (Bad Homburg), Whatman (Maidstone, GB). Radioisotope wurden von Amersham (Braunschweig) erworben.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

Für Klonierungen wurde ausschließlich DH5 α F' benutzt. Mutagenisierte Plasmide wurden auch in XL1-Blue transformiert.

DH5 α F': F'[\Phi80 (Δ lacZ) M15] Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* r_k⁻ m_k⁺ *supE44 thi-1 gyrA relA* (Hanahan, 1983; Woodcock *et al.*, 1989)

XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 lac[F' proAB lacI^dZ Δ M15 Tn10(Tet^r)]*^c

2.2.2 *C. albicans*-Stämme

Stamm	Beschreibung
SC5314	Wildtyp, prototroph (Fonzi und Irwin, 1993)
CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> (Fonzi und Irwin, 1993)
CAI8	<i>ade2::hisG/ade2::hisG, ura3::imm434/ura3::imm434</i> (Fonzi und Irwin, 1993)
HLC67	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
WO-1	Wildtyp, prototroph mit "white/opaque"-Phänotypwechsel (Slutsky <i>et al.</i> , 1987)
Red3/6	<i>ade2/ade2</i> -Derivat von WO-1 (Srikantha <i>et al.</i> , 1995)
BCa2-9	wie CAI4, aber <i>tup1::hisG/tup1::hisG</i> (Braun und Johnson, 1997)
BCa14-1	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG, efg1::hisG-URA3-hisG/EFG1</i> (Braun und Johnson, 1997)
CDB1	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG, efg1::hisG/efg1::hisG</i> (Bockmühl, 2001)
M231	wie CAI4, aber <i>tpk2::hisG/tpk2::hisG, tpk1::hisG/tpk1::hisG/URA3-PCK1p-TPK1</i> (M. Gerards)
CMP7	wie CAI4, aber <i>sir2::hisG/sir2::hisG</i> (J. Perez-Martin, pers. Mitteilung)
DSY1346	wie CAI4, aber <i>cap1::hisG/cap1::hisG</i> (Micheli, 2000)
LUC1/2/3/4	pBT-100A, <i>HpaI</i> linearisiert im <i>EFG1p</i> , integriert in CAI8 (diese Arbeit)
LUC5/6/7/8	pBT-100B, <i>HpaI</i> linearisiert im <i>EFG1p</i> , integriert in CAI8 (diese Arbeit)
LUC9/10	pBT-150A, <i>HpaI</i> linearisiert im <i>EFG1p</i> , integriert in CAI8 (diese Arbeit)
LUC11/12	pBT-150B, <i>HpaI</i> linearisiert im <i>EFG1p</i> , integriert in CAI8 (diese Arbeit)
LUC13/14	pBT-153A, <i>HpaI</i> linearisiert im <i>EFG1p</i> , integriert in CAI8 (diese Arbeit)
LUC15/16	pBT-153B, <i>HpaI</i> linearisiert im <i>EFG1p</i> , integriert in CAI8 (diese Arbeit)

2.2.3 Medien zur Anzucht von Bakterien

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

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C. Festen Nährböden enthielten 1,2 % Agar. Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenz wurde dem Medium Ampicillin [100 µg/ml] oder Kanamycin [50µg/ml] zugesetzt. Die Selektion auf lacZ-Aktivität erfolgte durch Zugabe von IPTG/X-Gal. Pro Platte wurden 100 µl einer Stammlösung mit 10 mg X-Gal und 2,4 mg IPTG/ ml DMF aufgebracht.

2.2.4 Medien zur Anzucht von Hefen

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

SD (Minimalmedium): 0,67 % Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (YNB w/o AS),
2 % Glukose

S4D: 0,67 % YNB w/o AS, 4 % Glukose

SCAA: 0,67 % YNB w/o AS, 2 % Casaminosäuren

Die Anzucht von Hefen erfolgte bei 30°C. Feste Medien enthielten 1,2 % Agar.

2.2.5 Spezielle Medien

2.2.5.1 Hypheninduktion

Die Induktion von Hyphen in *C. albicans* erfolgte ausschließlich in Medien mit 10 % Serum bei 37°C. Auf festen Medien (1,2 % Agar) wurden Vereinzlungsausstriche durchgeführt. Zur Induktion in Flüssigmedien wurden logarithmische Vorkulturen mit H₂O gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt.

2.2.5.2 Screening auf β-Galaktosidase-Aktivität

Der Test von *C. albicans*-Transformanten mit *LAC4*-Reportergen auf β-Galaktosidase-Aktivität wurde auf gepufferten X-Gal-SD-Platten (pH 7) durchgeführt. Pro Platte wurden 50 µl einer X-Gal-Lösung mit 40 mg/ml aufgebracht. Im Enzymtest wurden nur Transformanten verwendet, welche nach drei Tagen Wachstum bei 30°C eine Blaufärbung zeigten.

2.2.5.3 Induktion des *PCK1*-Promotors

Die Induktion des *PCK1*-Promotors erfolgte in SCAA-Medium. Zum Test der *EFG1*-Autoregulation wurden Vorkulturen in S4D mit H₂O gewaschen und in S4D und SCAA auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 angeimpft. Nach Wachstum über Nacht (ca.16h) wurden die Kulturen am Morgen wieder auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 eingestellt und bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 geerntet, so daß die Gesamtdauer der *PCK1p*-Induktion etwa 24 h betrug.

2.3 Vektoren und Primer

2.3.1 Basisvektoren

Vektor	Beschreibung
pUC18	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor (Yannish-Perron, 1985)
pUCBgl	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pUK21	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor (Viera und Messing, 1991)
p607/2	<i>EFG1</i> (Stoldt, 1995)
p606/1	<i>EFG1</i> (Stoldt, 1995)
pRS-LAC4	<i>LAC4</i> (Delbrück, 1994)
pRC18	<i>C.albicans</i> -Vektor (Stoldt <i>et al.</i> , 1997)
pCL76	<i>EFG1p::LAC4</i> in pRC18 (Stoldt <i>et al.</i> 1997)
pBI	<i>PCK1p</i> in pRC2312 (Rademacher, 1998)
pBT-3a	<i>C.albicans</i> -Vektor, <i>URA3</i> (Tebarth, 1998)
pBT-4	<i>C.albicans</i> -Vektor, <i>ADE2</i> (Tebarth, 1998)
pCA01	<i>PCK1p</i> in pUC21 (Sonneborn, 1999)
pAPE(2)/ADE	<i>PCK1p::EFG1</i> (Sonneborn <i>et al.</i> , 1999)
pRL-null	<i>RLUC</i> , <i>Renilla</i> luciferase (Promega)
pSFU1	<i>URA3</i> -Flipper in pBluescript (Morschhäuser <i>et al.</i> , 1999)
p1367/1	<i>URA3</i> in pUC18 (Losberger und Ernst, 1989)
pDB30	<i>EFH1</i> in pUC18 (Bockmühl, 2001)
pHIStag/C.TPK1	<i>C.albicans-TPK1</i> in pUC18 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pHIStag/C.TPK2	<i>C.albicans-TPK2</i> in pUC18 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pUC/C.TPK1	<i>C.albicans-TPK1</i> in pUC18 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pBI-HisC.TPK1	<i>C.albicans-TPK1</i> in pBI (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pBI/TPK	<i>C.albicans-TPK2</i> in pBI (M. Gerads, pers. Mitteilung)
p1595/3	<i>ACT1</i> in pBR322 (Delbrück und Ernst, 1993)
pUC19/EFG1	<i>EFG1</i> in pUC19 (Sonneborn, 1999)
pMi/UC700e	<i>EFG1p</i> -Subklon (Weide, 1997)
pWH11	<i>WH11</i> in pUC18 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
p26-6	<i>PCK1</i> in pUC21 (Leuker, 1996)

2.3.2 Vektorkonstruktionen

In numerischer Reihenfolge werden alle verwendeten Subklone, Zwischenkonstruktionen und *Candida*-Vektoren aufgeführt.

Vektor	Konstruktion
pBT-9	3,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus p607/2 in pUK21, <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II
pBT-10	3,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus p607/2 in pUCBgl, <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II
pBT-13	3,5 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sph</i> I-Fragment aus p606/1 in pUK21, <i>Bam</i> HI/ <i>Sph</i> I
pBT-15	4,2 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRS-LAC4 in pRC18, <i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I
pBT-16	2,5 kb <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pBT-9 in pUCBgl, <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III
pBT-17	5,8 kb <i>Bam</i> HI(part.)/ <i>Xba</i> I aus pCL76 in pBT-9, <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I
pBT-20	9,0 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-17 in pRC18, <i>Xba</i> I

pBT-23	2,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III-Fragment aus pBT-13 in pBI, <i>Bgl</i> III
pBT-25	9,0 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-17 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-29	1,0 kb <i>Hinc</i> II-Fragment aus pBT-9 in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-30	0,4 kb <i>Hinc</i> II-Fragment aus pBT-9 in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-31	4,2 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRS-LAC4 in pBT-9, <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I
pBT-32	0,4 kb <i>Hind</i> III/ <i>Xmn</i> I-Fragment aus pBT-9 (fill-in,Religation)
pBT-34	7,4 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-31 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-36	3,7 kb-PCR-Fragment (EFG5',EFG3') in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-37	0,8 kb <i>Bgl</i> III/ <i>Hinc</i> II-Fragment aus pBT-9 in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-39	1,0 kb <i>Ssp</i> I-Fragment aus pBT-16 in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-40	1,1 kb <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pBT-16 in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-41	0,7 kb <i>Hpa</i> I/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pBT-16 in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-44	1,4 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pCA01 in pBT-4, <i>Nhe</i> I
pBT-47	2,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III-Fragment aus pBT-13 in pBT-44, <i>Bgl</i> III
pBT-48	3,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> III-Fragment aus p607/2 in pBT-13, <i>Bam</i> HI
pBT-49	6,7 kb <i>Stu</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pBT-48 in pBT-3a, <i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I
pBT-50	0,7 kb <i>Bgl</i> III-Fragment aus pBT-36 in pBT-23, <i>Bgl</i> III
pBT-53	0,7 kb <i>Bgl</i> III-Fragment aus pBT-36 in pBT-47, <i>Bgl</i> III
pBT-55	Mutagenese mit EFG-T/A1,EFG-T/A2 auf pAPE(2)/ADE
pBT-66	0,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pBT-36 in pUK21, <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
pBT-67	4,2 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRS-LAC4 in pBT-66, <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I
pBT-68	4,4 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-67 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-69	1,0 kb <i>Nhe</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRL-null in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-70	3,5 kb <i>Stu</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pBT-13 in pBT-3a, <i>Sma</i> I/ <i>Xba</i> I
pBT-73	0,9 kb PCR-Fragment (delUTR1,delUTR2) in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-75	0,9 kb PCR-Fragment (delUTR3,delUTR4) in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-76	0,9 kb <i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pBT-73 in pSFU1, <i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I
pBT-77	0,9 kb <i>Not</i> I/ <i>Sac</i> I-Fragment aus pBT-75 in pBT-76, <i>Not</i> I/ <i>Sac</i> I
pBT-79	1,0 kb <i>Nhe</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRL-null in pBT-9, <i>Xba</i> I
pBT-89	4,2 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-79 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-95	2,8 kb <i>Stu</i> I/ <i>Xmn</i> I-Fragment aus pBT-9 (fill-in,Religation)
pBT-96	4,2 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRS-LAC4 in pBT-95, <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I
pBT-99	4,5 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-96 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-100	4,2 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-79 in p1367/1, <i>Xba</i> I
pBT-101	338 bp PCR-Fragment (DEL _a ,DEL _c) in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-102	284 bp PCR-Fragment (DEL _b ,DEL _c) in pUC18, <i>Sma</i> I
pBT-103	117 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pBT-101 in pUK21, <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
pBT-104	63 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI- Fragment aus pBT-102 in pUK21, <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
pBT-105	4,2 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRS-LAC4 in pBT-103, <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I
pBT-106	4,2 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRS-LAC4 in pBT-104, <i>Eco</i> RV/ <i>Xba</i> I
pBT-107	4,3 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-105 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-108	4,3 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-106 in pBT-3a, <i>Xba</i> I
pBT-110	FRT1,FRT2 nach Hybridisierung in pBT-9, <i>Bam</i> HI
pBT-120/-121	Mutagenese mit 7GT4GT,4CA7CA auf pBT-34
pBT-122/-123	Mutagenese mit 7GT4GT,4CA7CA auf pBT-68
pBT-140/-141	Mutagenese mit T248E1,T248E2 auf pAPE(2)/ADE
pBT-145	2,1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pDB30 in pBT-44, <i>Bgl</i> III
pBT-146	2,1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pDB30 in pUK21, <i>Bam</i> HI
pBT-148/-149	Mutagenese mit del2-10,del10-2 auf pBT-68
pBT-150	Mutagenese mit LUC107a,LUC107b auf pBT-100
pBT-151	1,3 kb <i>Bgl</i> III-Fragment aus pHIS _{tag} /C.TPK1 in pBT-44, <i>Bgl</i> III
pBT-152	1,3 kb <i>Bgl</i> III-Fragment aus pHIS _{tag} /C.TPK2 in pBT-44, <i>Bgl</i> III
pBT-153	Mutagenese mit LUC108a,LUC108b auf pBT-100
pBT-154	1,0 kb <i>Nhe</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pRL-null (fill-in) in pBT-110, <i>Eco</i> RV
pBT-155	4,3 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pBT-154 in p1367/1, <i>Xba</i> I
pBT-156	Mutagenese mit LUC109a,LUC109b auf pBT-100
pBT-157	Mutagenese mit LUC112a,LUC112b auf pBT-153

2.3.3 Synthetische Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Verwendung
EFG5'	5' -TTAAGATCTCTTGCTAAATACGTTTCTATCCG-3'	pBT-36
EFG3'	5' -TTAAGATCTGCATGCTTACTTTCAAATTGTG-3'	pBT-36
del3a	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAACATGCCACCGC-3'	pBT-42
del3b	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCGATCCAAACCTTTCG-3'	pBT-42
del1a	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTTTTCGTGCAGATCT-3'	pBT-43
del1b	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTATAGTAATATTCTG-3'	pBT-43
del2c	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTATACACATATACACACGGAAG-3'	pBT-46/-62/-72
EFG-T/A1	5' -CAGACCACGAGTCGCGACTACCATGTGG-3'	pBT-55
EFG-T/A2	5' -CCACATGGTAGTCGCGACTCGTGGTCTG-3'	pBT-55
del1c	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTTGAGTTTTCGTGCAGATCT-3'	pBT-61
del1d	5' -AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTATAGTAATATTCTGCTGAGTA-3'	pBT-61
del3f	5' -AGATAAGAATGCGGCCGCGGTGGGAGCAAACCTAAG-3'	pBT-63
delUTR1	5' -ATTGGTACCTGTGCATTGTCAATTTTGTGTATATGTGC-3'	pBT-73
delUTR2	5' -ATTCTCGAGCAACCAAGTCTATTTGATAGATAGATAG-3'	pBT-73
delUTR3	5' -ATTGCGGCCGCGTTCTATTTGACTACCAAGAATATAACCC-3'	pBT-74
delUTR4	5' -ATTGAGCTCGGATACAACATATCCACAATTTGTTTCACG-3'	pBT-74
DELa	5' -GTATATTCCATACTACCAACAGG-3'	pBT-101
DELb	5' -GGGAGCAAACCTAAGAAAAGTAG-3'	pBT-102
DELc	5' -GGGATAGTTGGATAATTGGATAG-3'	pBT-101/-102
FRT1	5' -GATCCGAAGTTCCATTTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCA-3'	pBT-110
FRT2	5' -GATCTGAAGTTCCATATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCG-3'	pBT-110
EFG/TSP5'	5' -TTAAGATCTCTAAAAAGAATTTATCAAGTGAG-3'	pBT-118
EFG/TSP3'	5' -TTAAGATCTGAAATCTCTTTTAAATGTAATG-3'	pBT-118/-119
7GT4GT	5' -GGGAGCAAACCTAAGAAAATTATAAATATAATAACATCC-3'	pBT-120/-121
4CA7CA	5' -GGATGTTATTTATATTTATAATTTTCTTAGTTTTGCTCCC-3'	pBT-122/-123
T248E1	5' -CAATGTGGCCCAAATGGAACGTGGTAGAAGAG-3'	pBT-140/-141
T248E1	5' -CTCTTCTACCACGTTCCATTTGGGCCACATTG-3'	pBT-140/-141
del2-10	5' -GGATCCCTTTTGGATGTTATTTATATTTCTTAGTTTTGCTCCCACCC-3'	pBT-148/-149
del10-2	5' -GGGTGGGAGCAAACCTAAGAATATAAATAACATCCAAAAGGATCC-3'	pBT-148/-149
LUC107a	5' -CAAGTGAGTGAGAAGTAGTAGAAGGGTATATTTCCATACTACCAACA GG-3'	pBT-150
LUC107b	5' -CCTGTTGGTAGTATGGAATATACCCTTCTACTACTTCTCACTCACT TG-3'	pBT-150
LUC108a	5' -CAAGTGAGTGAGAAGTAGTAGAAGGGGAGCAAACCTAAGAAAAGT AG-3'	pBT-153
LUC108b	5' -CTACTTTTCTTAGTTTTGCTCCCCCTTCTACTACTTCTCACTCACT TG-3'	pBT-153
LUC109a	5' -CAAGTGAGTGAGAAGTAGTAGAAGGGAAATATAAATAACATCCAAA AGG-3'	pBT-156
LUC109b	5' -CCTTTTGGATGTTATTTATATTTCCCTTCTACTACTTCTCACTCAC TTG-3'	pBT-156
LUC112a	5' -GCAAACCTAAGAAAAGTACATCCAAAAGGATCC-3'	pBT-157
LUC112b	5' -GGATCCCTTTTGGATGTACTTTTCTTAGTTTTGTC-3'	pBT-157
5'RACE/SP1	5' -CGGGTTAGTGCAATGAATAATGG-3'	5'RACE
5'RACE/SP2	5' -GGGACTTGAAATAACCTTATGTGAATCGC-3'	5'RACE
5'RACE/SP3	5' -CGCGAGTAGATGGGTAGGGCAATTGG-3'	5'RACE
70/RACE/SP1	5' -CCATTGTAATGCTGAGGTTGTGGC-3'	5'RACE
70/RACE/SP2	5' -GGTAATAGTTTCCCTTGAGATGTTGCGGC-3'	5'RACE
70/RACE/SP3	5' -GGTATTGTAATCATATTGTTGCTGCTGC-3'	5'RACE
EFG/SP1	5' -GCAGAAGTGGCAGTGGCAGC-3'	RNaseH
EFG/rev	5' -CGTTGAGCCATGGCCAATGCTC-3'	RNaseH

2.4 Transformation

2.4.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde nach der Methode von Hanahan (1983) durchgeführt.

2.4.2 Transformation von *C. albicans*

Sphäroplasten von *C. albicans* wurden nach Sherman *et al.* (1986), modifiziert von Srikantha *et al.* (1995) transformiert.

2.5 Methoden zur Analyse von DNA

Generell wurden die von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Standardmethoden angewendet.

2.5.1 Klonierung

Die Restriktion von DNA erfolgte nach den Angaben der Hersteller (Roche, NEB, Gibco BRL, MBI Fermentas). Das Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Fragment sowie die Dephosphorylierung von 5'-Enden wurde nach Herstellerangaben (Roche) durchgeführt. Überstehende DNA-Enden wurden 1/2h bei Raumtemperatur (RT), glatte Enden über Nacht bei 16°C ligiert. Die Hybridisierung einzelsträngiger DNA-Oligos zu doppelsträngiger DNA erfolgte nach Denaturierung (95°C, 5 min.) durch langsames Abkühlen (1h) auf RT.

2.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen kam der Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden) zum Einsatz.

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

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Größere Mengen Plasmid-DNA (100µg) wurden mit dem Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) präpariert.

2.5.4 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe

Die Isolation genomischer DNA aus *C. albicans* erfolgte nach Sherman *et al.* (1986). Eine stationäre 5 ml Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (5 min., 3000 Upm), in Wasser gewaschen, in 400-800 µl SCE/Zymolyase-Lösung resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Sphäroplasten wurden für 5 min bei 4.000-6000 Upm pelletiert und in 500 µl EDTA (50 mM, pH 8) aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte nach Zugabe von 50 µl SDS-Lösung (10%) durch Inkubation bei 65°C (30 min.). Durch Zugabe von 100 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung wurden denaturierte Proteine ausgefällt und abzentrifugiert (15 min, 13.000 Upm, 4°C). Die DNA wurde mit 2-3 Volumen Ethanol (96%) unter Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, 4°C) gefällt und in 400 µl RNase-Lösung resuspendiert und inkubiert (1/2 h, 37°C). Nach Phenol/Chloroform-Extraktion folgte eine abschließende Ethanol-fällung. Die getrocknete DNA wurde in 100 µl TE-Puffer rückgelöst (1/2 h, 37°C).

SCE/Zymolyase-Lösung	1,0 M Sorbit; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA (pH 7) 200 µg/ml Zymolyase (100T), 20 mM DTT
RNase-Lösung	150 mM Natriumacetat (pH 5,9), 200 µg/ml RNaseA, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8) ; 1 mM EDTA pH 8,0

2.5.5 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden in Auftragsarbeit vom BMFZ, Universität Düsseldorf oder der Firma Seqlab (Göttingen) ausgeführt.

2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des Expand High Fidelity Kit oder des Expand Long Template Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei Mutagenesen kam der Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene zum Einsatz.

2.5.7 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über Southern-Blot-Analyse

Genomische DNA (1-2 µg) wurde über Nacht mit Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt und mittels Vacu-Blot (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) transferiert. Nach UV-Fixierung (3 min.) erfolgte die Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Fragmenten (Feinberg und Vogelstein, 1983) bei 68°C über Nacht. Zur Detektion wurde der DIG DNA Labeling and Detection Kit der Firma Roche eingesetzt.

2.6 Methoden zur Analyse von RNA

2.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe

Zur Isolierung von Gesamt-RNA nach Schmitt et al. (1990) wurden 30 ml Hefekulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 geerntet. Die RNA wurde in Ethanol fällung bei -20°C gelagert.

2.6.2 Präparation von mRNA

Zur Aufreinigung von mRNA wurde der Oligotex mRNA Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt.

2.6.3 5'RACE

Zur Bestimmung des Transkriptstartpunktes kam der 5'/3'RACE Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben zur Anwendung.

2.6.4 Restriktion von RNA mit RNaseH

Zur Restriktion von RNA mit RNaseH wurde die Methode von Mercer und Wake (1985) folgendermaßen modifiziert.

30 µg Gesamt-RNA wurden in 18,5 µl EDTA (1 mM) rückgelöst. Nach Denaturierung (95°C, 5 min.) wurden 0,5 µl Oligonukleotid (50 pmol) zugesetzt. Nach Inkubation bei 50°C (10 min.) wurde 1 µl KCl (1M) zugegeben und erneut für 10 min. bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl einer RNaseH-Lösung (28mM MgCl₂, 20mM TRIS/HCl (pH8), 0,5 mM EDTA (pH8), 0,5 U RNaseH (Pharmacia)) zugesetzt. Einer Inkubation bei 37°C für 15 min. folgte nach Zugabe von 160 µl Wasser ein Phenol-Chloroform-Extraktion. Durch Zugabe von 20 µl NaAc (3M, pH 5,2) und 500 µl Ethanol (abs.) wurde die geschnittene RNA über Nacht gefällt und im Northern-Blot eingesetzt.

2.6.5 Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über Northern-Blot-Analyse

Die radioaktive Markierung erfolgte nach dem Prinzip des "random priming" (Feinberg und Vogelstein, 1983) mit dem "Random Primed Labeling Kit" von Boehringer, Mannheim. In einem Reaktionsansatz von 20 µl erfolgte die Markierung von 50-100 ng frisch denaturierter DNA bei 37°C für 2 h. Hierbei kamen 50 µCi [α - ³²P] dATP zum Einsatz. Die markierte DNA wurde durch Sephadex G50-Säulen (in TEN-Puffer (0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH8), 1 mM EDTA (pH8) gelöst) zentrifugiert und nach Denaturierung (15 min., 95°C) zur Hybridisierung eingesetzt. In einem Agarosegel (1,2 %) wurden 30 µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Der RNA-Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) erfolgte mit einem Kapillar-Blot über Nacht (Sambrook *et al.*, 1989). Als Blot-Puffer wurde 20xSSPE

(3,6 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M EDTA (pH 7,4)) mehrfach verwendet. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV - Licht (254 nm, 3 min.) und anschließender Inkubation bei 80°C (2 h).

Nach Inkubation in Prähybridisierungslösung (SSPE (5x), 50% deionisiertes Formamid, 1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % BSA, 0,5 % SDS, 50 ng denaturierte Heringssperma - DNA) für mindestens 1 h bei 42°C erfolgte die Zugabe der frisch denaturierten Sonde 1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % BSA. An die Hybridisierung über Nacht bei 42°C schlossen sich je zwei Waschschrte in Lösung I (0,1 % SDS, 2xSSPE, 10 min.) und Lösung II (0,1 % SDS, 1 x SSPE, 10 min., 50°C) an. Die Detektion erfolgte über Autoradiographie mit Kodak-X-OMAT AR - Röntgenfilmen bei -70°C.

Die in der Northern-Analyse verwendeten Sonden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Transkript	Sonde
<i>ACT1</i>	1500 bp <i>ClaI/SalI</i> -Fragment aus p1595/3
<i>EFG1</i>	1500 bp <i>NheI</i> -Fragment aus pUC19/EFG1
<i>EFG1</i> (3' Ende)	492 bp <i>SpeI/NheI</i> -Fragment aus pUC19/EFG1
<i>EFG1</i> (5' UTR)	664 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pMi/UC700e
<i>EFH1</i>	2172 bp <i>BamHI</i> -Fragment aus pBT-146
<i>LAC4</i>	879 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pRS-LAC4
<i>TPK1</i>	1228 bp <i>BamHI/BglIII</i> -Fragment aus pUC/C.TPK1
<i>TPK2</i>	1257 bp <i>BamHI/BglIII</i> -Fragment aus pHIStag/C.TPK2
<i>WH11</i>	220 bp <i>BamHI</i> -Fragment aus pWH11
<i>PCK1</i>	488 bp <i>BamHI/HpaI</i> -Fragment aus p26-6

Tabelle 1 : DNA-Sonden zur Northern-Analyse

2.7 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.7.1 Herstellung von Rohextrakten aus Hefe

Die Hefekulturen (5 ml) wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 geerntet (3 min, 13.000 Upm, 4°C). Nach einmaligem Waschen in dem entsprechenden Puffer des Enzymtestes (Galactolight-Puffer, Passive Lysis Buffer) wurden die Zellen entweder bis zu einer Woche bei -20°C gelagert oder direkt einem Zellaufschluß unterzogen. Nach Zugabe von 100 µl Glasperlen (4°C) und 150-300 µl Puffer (4°C) wurden die Zellen in 2ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) bei maximaler Geschwindigkeit auf einem Vibrax bei 4°C geschüttelt, gefolgt von einer Zentrifugation (10 min., 13.000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde erneut abzentrifugiert (2 min., 13.000 Upm, 4°C), so daß ein klares Rohextrakt gewonnen wurde. Dieses wurde unmittelbar in den Enzymtest eingesetzt.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Rohextrakten erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) bei 595 nm in einem Beckmann-Photometer (DU 7400) unter Verwendung des Bradford-Reagenzes der Firma BIO-RAD anhand einer BSA-Eichkurve.

2.7.3 Messung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem Galactolight Kit der Firma Tropix bestimmt. In weißen 96er Platten der Firma LabSystems (cliniplate) wurden 80 μ l Substrat (Galacton Plus) vorgelegt. Durch Zugabe von 10 μ l Rohextrakt (1-10 μ g) wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 125 μ l Verstärker (Galactolight Emission Accelerator) gestoppt und die Lichtemission verstärkt. In einem Luminometer der Marke Fluoroskan Ascent FL der Firma LabSystems wurde unmittelbar über ein Zeitintervall von 10 Sekunden die gesamte emittierte Lichtmenge detektiert. Dabei lagen die Werte zwischen 10,0 - 0,001 RLU (relative light units, siehe Anhang I-IV). Diese relativen Werte wurden auf die Proteinkonzentration bezogen, da die Zelldichte angesichts des pseudohyphalen Wachstums eine ungeeignete Bezugsgröße darstellt. Zur Berechnung der autoregulatorischen Repression wurde der Quotient aus der Aktivität unter Repression des *PCK1*-Promotors und der Aktivität unter Induktion des *PCK1*-Promotors (*EFG1*-Überexpression) gebildet.

2.7.4 Messung der Luziferase-Aktivität

Die Luziferase-Aktivität wurde unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay System der Firma Promega in einem Luminometer der Marke Fluoroskan Ascent FL der Firma LabSystems bestimmt. In weißen 96er Platten der Firma LabSystems (cliniplate) wurden 50-100 μ l LARII-Reagenz vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l Rohextrakt (1-10 μ g) gestartet. Über 10 Sekunden wurde unmittelbar die Hintergrundaktivität bestimmt, welche jedoch unter der Nachweisgrenze lag. Nach Zugabe von 50-100 μ l Stop&Glo-Reagenz wurde über 10 Sekunden die Aktivität der Renilla Luziferase bestimmt. Die Werte zwischen 10 - 0,001 RLU wurden auf die Proteinkonzentration bezogen. Die autoregulatorische Repression wurde als Quotient von Aktivität unter reprimierter *EFG1*-Expression und induzierter *EFG1*-Expression berechnet.

2.8 Disruption der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes

Zur Disruption der 5'-untranslatierten Region des langen *EFG1*-Transkriptes am *EFG1*-Locus wurden mittels PCR sowohl aus dem Bereich des Hauptpromotors (Oligonukleotide delUTR1, delUTR2) als auch aus dem Bereich des ORF von *EFG1* (Oligonukleotide delUTR3 und delUTR4) ca. 0,9 kb große Abschnitte amplifiziert und in die Vektoren pBT-73 und pBT-75 kloniert. Aus dem Vektor pBT-73 wurde der 3'-Bereich des *EFG1*-Promotors (inklusive des Transkriptionsstartpunktes des langen Transkriptes) mit *KpnI/XhoI* herausgeschnitten und in den Vektor pSFU1 kloniert (Morschhäuser *et al.*, 1999), welcher die URA-Flipper-Kassette beinhaltet, wobei der Vektor pBT-76 entstand. Aus dem Vektor pBT-75 wurde der 5'-Bereich des ORF mit *NotI/SacI* herausgeschnitten und in den Vektor pBT-76 kloniert, wobei der Vektor pBT-77 entstand. Aus diesem wurde die vollständige Disruptionskassette mit *KpnI/SacI* herausgeschnitten und zur Deletion der 5'UTR in die verschiedenen Stämme transformiert.

Sequenz des disruptierten *EFG1*-Locus in den 5'UTR-Mutanten (Beginn: TSP; Ende: ATG):
 5'-TTACATTTAAAAGAGATTTTCATTTTATTAATTTGAATAATCTATCATCTATCAA
 ATAGACTTGGTTGG GGTACCGGGCCCCCCTCGAG **GAAGTTCCTATACTTTCT**
AGAGAATAGGAACTTC AGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGC GTTCTATTTGA
 CTACCAAGAATATAACCCATATTA-3' (FRT-Sequenz fett gedruckt).

3 Ergebnisse

Der Transkriptionsfaktor Efg1p stellt einen zentralen Regulator der Morphogenese von *C. albicans* dar. Er ist sowohl in die Steuerung des Hyphenwachstums, welches als bedeutender Pathogenitätsfaktor angesehen wird (Odds, 1988), als auch in die Chlamydosporenbildung involviert (Sonneborn, 1999). Darüberhinaus führt die Überexpression von *EFG1* zur Filamentation in Form von Pseudohyphen (Stoldt *et al.*, 1997). Als Transkriptionsfaktor obliegt ihm die Funktion, die Expression von Zielgenen durch Bindung an ihre Promotoren zu regulieren. Der Regulation der Expression dieses Transkriptionsfaktors kommt neben seiner Aktivierung eine entscheidende Bedeutung zu, da schon geringe Unterschiede in seinem Expressionsniveau durch die verstärkende Wirkung der Signaltransduktionskaskade erheblichen Einfluß auf die verschiedenen Entwicklungsprogramme entfalten können. Eine stabile Wachstumsform von *C. albicans* setzt einen konstanten Transkriptspiegel von *EFG1* voraus. Da die Deletion von *EFG1* eine deutlich reduzierte Virulenz im Mausmodell zeigt (Lo *et al.*, 1997), ist die Identifizierung von regulatorischen Domänen im *EFG1*-Promotor im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antimykotika von besonderem Interesse, da durch die gezielte Hemmung der *EFG1*-Expression eine Reduktion der Virulenz möglich ist. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen zur Expression von *EFG1* und der sie vermittelnden regulatorischen Elemente, wobei neben dem Promotor des Haupttranskriptes auch eine regulatorische Funktion seines 5'-untranslatierten Bereiches (5'UTR) untersucht wurde. Als Grundlage für alle weiteren Experimente wurde am Beginn dieser Arbeit der Startpunkt des Haupttranskriptes bestimmt.

3.1 Northern-Analyse der *EFG1*-Expression

Ausgangspunkt zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von *EFG1* war die Diskrepanz zwischen dem nur 1,6 kb großen offenen Leserahmen und dem 3,2 kb großen Transkript von *EFG1* (Stoldt *et al.*, 1997).

Die Bestimmung eines Startpunktes an Position -35 (Stoldt, 1995) legte entweder die Existenz eines ca. 1,6 kb großen 3'-untranslatierten Bereiches oder eine extreme Polyadenylierung des 3'-Endes nahe. Im Rahmen zahlreicher Transkriptanalysen von *EFG1* konnte jedoch neben dem 3,2 kb großen *EFG1*-Haupttranskript (Stoldt, 1995) ein deutlich geringer exprimiertes ca. 2,1 kb großes Transkript detektiert werden. Die Kombination einer großen Menge RNA (30 µg), einer besonders stark radioaktiven Sonde und einer langen Expositionsdauer des Röntgenfilmes (ca. eine Woche) ermöglichten die Detektion des kleineren Transkriptes (Abb. 5).

Aufgrund des Versuchsansatzes (S1-Nuclease) zur Bestimmung des Startpunktes durch Stoldt (1995), erschien es möglich, daß er einen Start des kleinen Transkriptes bestimmt hatte. Aus dieser Annahme ergab sich die Notwendigkeit zur Kartierung des *EFG1*-Haupttranskriptes, da

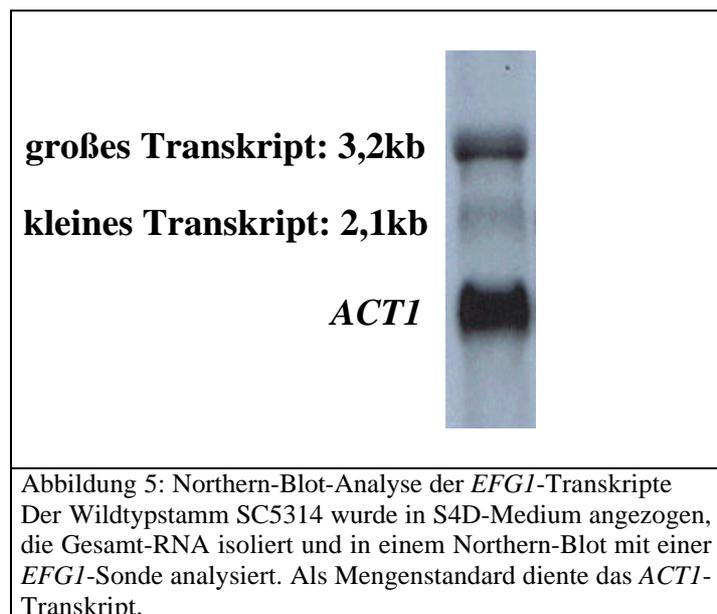


Abbildung 5: Northern-Blot-Analyse der *EFG1*-Transkripte. Der Wildtypstamm SC5314 wurde in S4D-Medium angezogen, die Gesamt-RNA isoliert und in einem Northern-Blot mit einer *EFG1*-Sonde analysiert. Als Mengenstandard diente das *ACT1*-Transkript.

im S1-Nuklease-Ansatz von Stoldt (1995) wegen der Kürze des hybridisierten Fragmentes (341 bp) im S1-Nuclease-Ansatz eine potentiell 1,6 kb große 5'-untranslatierte Region nicht bestimmt werden konnte.

3.2 Kartierung der *EFG1*-Transkripte

3.2.1 Northern-Analyse des Haupttranskriptes nach RNaseH-Restriktion

Als Versuchsansatz zur Bestimmung der Größe von 5'UTR und 3'UTR des *EFG1*-Haupttranskriptes wurde eine sequenzspezifische Restriktion der mRNA gewählt (Abb. 6). Zu diesem Zweck wurde die *EFG1*-mRNA mit zwei Oligonukleotiden (A, B) aus dem Bereich des *ORF* hybridisiert, so daß partielle Doppelstränge aus DNA und RNA entstanden. Durch den Einsatz von RNaseH, welche diese RNA/DNA-Hybride abbaut, konnte die mRNA sequenzspezifisch geschnitten werden. Die Verwendung von Sonden sowohl aus dem 5'- als auch aus dem 3'-flankierenden Bereich der Schnittstellen erlaubte die exakte Identifizierung der produzierten mRNA-Fragmente. Mit einer nahezu den ganzen *ORF* umfassenden 1500 bp-Sonde konnten neben dem ungeschnittenen 3,2 kb-Haupttranskript jeweils zwei mRNA-Fragmente detektiert werden (Oligo A: 2,1 kb und 1,1 kb; Oligo B: 2,0 kb und 1,2 kb). Während mit der 3'-Sonde (492 bp *SpeI/NheI*-Fragment aus pUC19/*EFG1*) die kleineren Fragmente (1,1 kb und 1,2 kb) nachgewiesen wurden, konnten mit der 5'-Sonde (664 bp *EcoRI*-Fragment aus pMi/UC700e) die größeren Fragmente (2,1 kb und 2,0 kb) eindeutig dem 5'-flankierenden Bereich der Schnittstellen zugeordnet werden. Basierend auf der Position der Schnittstellen (Oligo A: ca. 975; Oligo B: ca. 850) konnte eine 5'UTR von ca. 1,2 kb für das große *EFG1*-Transkript postuliert werden. Zusätzlich führte der Einsatz einer Sonde aus dem Bereich der 5'UTR zur Detektion des 3,2 kb großen *EFG1*-Haupttranskriptes (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Northern-Analyse der mRNA-Fragmente deuteten weiterhin auf eine ca. 400 bp große 3'UTR des *EFG1*-Haupttranskriptes. In einer 3'RACE wurde die exakte Größe der 3'UTR mit 412 bp bestimmt, wobei jedoch nicht zwischen den beiden *EFG1*-Transkripten unterschieden wurde (M. Gerards, pers. Mitteilung).

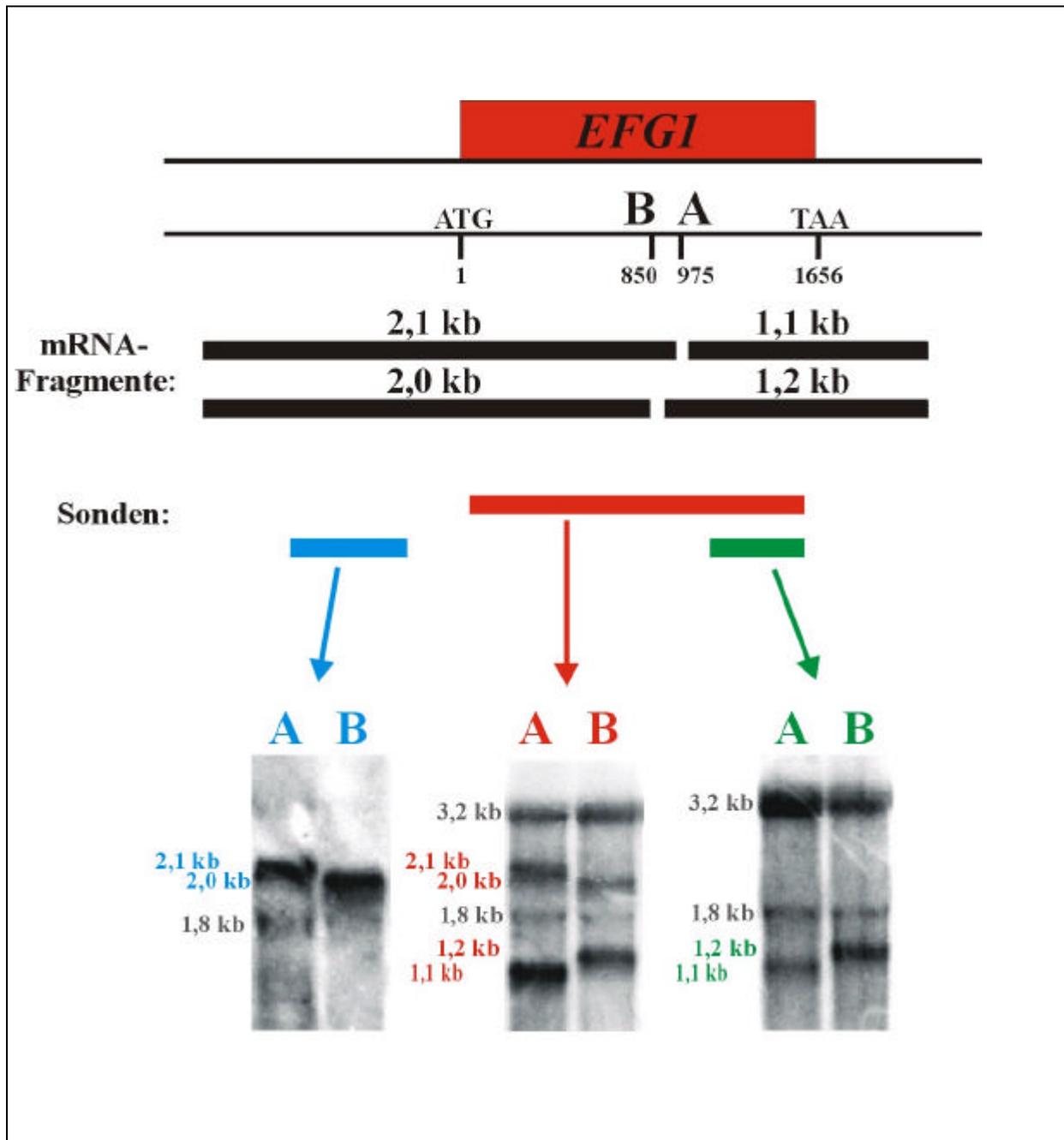


Abbildung 6: Northern-Analyse des langen *EFG1*-Transkriptes nach RNaseH-Restriktion

Das *EFG1*-Haupttranskript wurde mit den Oligonukleotiden A (EFG/SP1) oder B (EFG/rev) hybridisiert und an diesen Stellen durch die doppelstrangspezifische RNaseH geschnitten. Die dargestellten mRNA-Fragmente wurden mit den angegebenen Sonden in Northern-Blots nachgewiesen

Als Sonden wurden ein 664 bp *EcoRI*-Fragment aus der 5'UTR zur Detektion des 5'-RNA-Fragmentes (blau), ein 492 bp *SpeI/NheI*-Fragment vom 3'Ende des *ORF* zur Detektion des 3'-RNA-Fragmentes (grün) sowie ein 1500 bp *NheI*-Fragment des *ORF* zur Detektion beider RNA-Fragmente (rot) eingesetzt. Weiterhin ist die Größe der mRNA-Fragmente in den Northern-Blots (2,1/2,0 kb; 1,2/1,1 kb) markiert, wobei die kleine ribosomale RNA bei 1,8 kb als Hintergrund auftritt und ebenfalls noch ungeschnittenes *EFG1*-Transkript (3,2 kb) detektiert wird.

3.2.2 5'RACE des *EFG1*-Haupttranskriptes

Die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der *EFG1*-Transkripte erfolgte in einer 5'-RACE („rapid amplification of cDNA ends“). Nach der „Umschreibung“ der *EFG1*-mRNA in cDNA mit Hilfe eines spezifischen Oligonukleotids (SP1), folgten zwei PCR-Reaktionen zur Amplifikation der cDNA mit jeweils stromaufwärts liegenden Primern (SP2, SP3). Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert.

Nachdem die ungefähre Größe der 5'UTR des Haupttranskriptes bekannt war (ca. 1,2 kb; siehe 3.2.1), konnten die Oligonukleotide für eine exakte Bestimmung des Startpunktes des langen *EFG1*-Transkriptes in Stamm SC5314 über 5'RACE so gewählt werden, daß PCR-Produkte von geeigneter Größe (ca. 400 bp) entstanden.

In Abbildung 7 ist die Lage von drei auf diese Weise bestimmten Startpunkten markiert, von denen der am weitesten 5'-liegende (Position -1169 relativ zum ATG) als Startpunkt des *EFG1*-Haupttranskriptes angesehen wird. Im Stamm WO-1 wurde der Start des langen *EFG1*-Transkriptes am vorangehenden C-Nukleotid beschrieben (Srikantha *et al.*, 2000). Die anderen Startpunkte könnten auch durch z.T. degradierte Transkripte des Hauptstartpunktes entstanden sein.

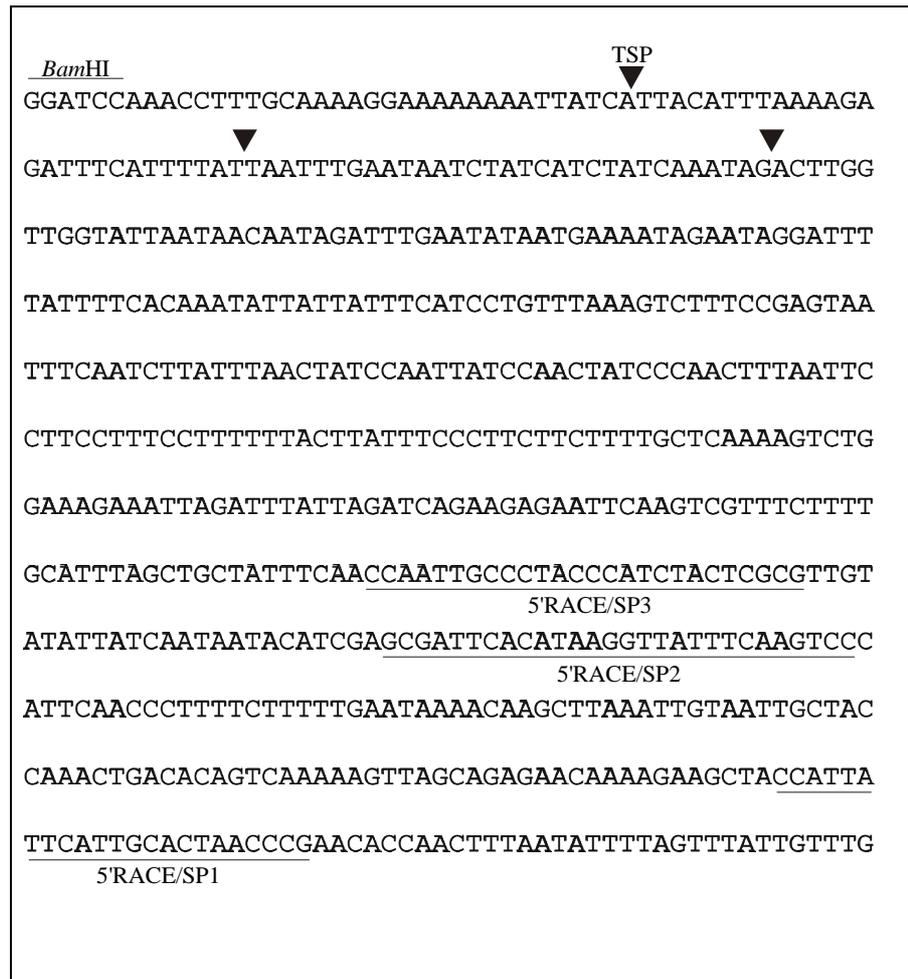


Abbildung 7: Transkriptionsstart des großen *EFG1*-Transkriptes

Die Pfeile kennzeichnen neben dem an Position -1169 bestimmten Transkriptionsstartpunkt (TSP) zwei weitere Produkte der 5'RACE (-1142; -1111). Die *Bam*HI-Schnittstelle markiert das 5'-Ende der Region, welche von Weide (1997) für Reportergenexperimente benutzt wurde und als Promotor des kleinen *EFG1*-Transkriptes bezeichnet werden kann. Zusätzlich wird die Lage der verwendeten komplementären Oligonukleotide (5'RACE/SP1, 5'RACE/SP2, 5'RACE/SP3) angegeben.

3.2.3 5'RACE des *EFG1*-Nebentranskriptes

Ein Transkriptionsstartpunkt von *EFG1* war von Stoldt (1995) mit einem S1-Nuklease-Ansatz an Position -35 bestimmt worden (Abb. 8). Dabei handelte es sich jedoch, wie sich erst im Verlauf dieser Arbeit herausstellte, vermutlich um einen Startpunkt des sehr schwach exprimierten kurzen *EFG1*-Transkriptes. Srikantha (1999) bestimmte mit Hilfe einer 5'RACE in der „opaque“-Form des Stammes WO-1 einen Startpunkt des kurzen *EFG1*-Transkriptes an Position -165 (Abb. 8). Mit derselben Methode wurde mit den Primern 70/RACE/SP1, 70/RACE/SP2 und 70/RACE/SP3 der Startpunkt des *EFG1*-Nebentranskriptes bestimmt.

Da der stromaufwärts gelegene Startpunkt des *EFG1*-Haupttranskriptes bereits bekannt war (siehe 3.2.2) und vermieden werden sollte, daß das lange *EFG1*-Transkript oder seine Abbauprodukte zu 5'RACE-Produkten führen, wurde in die *efg1/cph1*-Mutante CDB1 das Plasmid pBT-70 transformiert, welches nur den Promotor des kurzen Transkriptes (beginnend mit der *Bam*HI-Schnittstelle) und den *ORF* von *EFG1* enthält. Somit war sichergestellt, daß lediglich das kurze *EFG1*-Transkript, wenn auch von einem Plasmid, exprimiert wurde.

Der Startpunkt des kurzen *EFG1*-Nebentranskriptes wurde auf diese Weise an Position -73 relativ zum ATG bestimmt (Abb. 8)

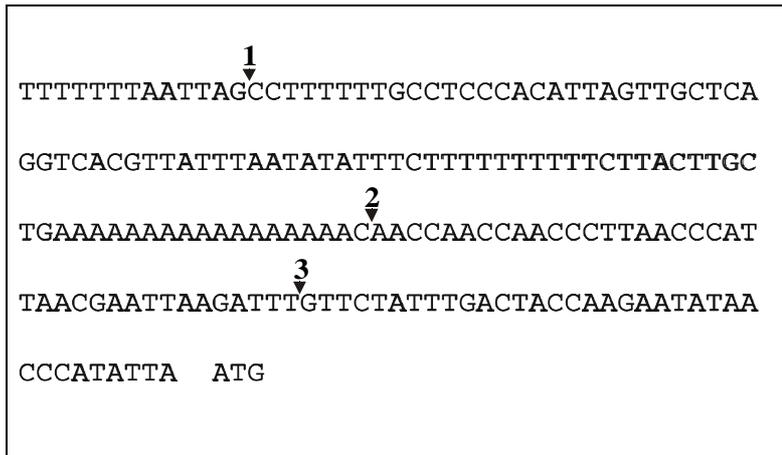


Abbildung 8: Startpunkte des kleinen *EFG1*-Transkriptes
Die Pfeile markieren die verschiedenen Transkriptionsstartpunkte des kleinen *EFG1*-Transkriptes (1: -165; Start in „opaque“-Form des Stammes WO-1 (Srikantha *et al.*, 1999); 2: -73; Start in Stamm CDB1 vom Plasmid pBT-70 (diese Arbeit); 3: -35; Start in Stamm SC5314 (Stoldt, 1995)).

3.3 Subklonierung und Sequenzierung des *EFG1*-Hauptpromotors

Die in Abschnitt 3.2.1 identifizierte 5'UTR des *EFG1*-Haupttranskriptes umfaßt beinahe die gesamte von Weide (1997) als *EFG1*-Promotor angesehene Sequenz. Dabei handelt es sich jedoch um den Promotor des *EFG1*-Nebentranskriptes, so daß sich die folgenden Arbeiten auf den Promotor des *EFG1*-Haupttranskriptes konzentrierten.

Aus dem *EFG1*-Klon p607/2 (Stoldt, 1995), wurde ein stromaufwärts der *Bam*HI-Schnittstelle (Abb. 7) gelegenes 3,2 kb *Bgl*III/*Bam*HI-Fragment subkloniert und sequenziert, da zu diesem Zeitpunkt das Sequenzierungs-Projekt von *C. albicans* die entsprechende Sequenz noch nicht enthielt. Dieses Fragment wird im weiteren als Promotor des langen *EFG1*-Transkriptes oder als Hauptpromotor von *EFG1* bezeichnet. Abbildung 9 gibt die Lage der von beiden Seiten sequenzierten Subklone wieder.

Das bereits von Weide (1997) in eine Richtung sequenzierte ca. 650 bp große *HindIII/BamHI*-Fragment am 3'-Ende des Hauptpromotors (pMi/UC650bh) wurde aufgrund seiner besonderen Bedeutung für die Funktion des Promotors erneut in beide Richtungen sequenziert.

Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt der 3'-Region des *EFG1*-Hauptpromotors. Die veröffentlichte Gesamtsequenz des *EFG1*-Locus (Accession Z32687) geht auf den Stamm ATCC10231 zurück, aus dessen Genbank der *EFG1*-Klon p607/2 über seine die Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* verstärkende Wirkung isoliert wurde (Stoldt *et al.*, 1997). Ein Vergleich mit

der mittlerweile vorliegenden Sequenz des Genom-Sequenzierungsprojektes, in dem der Stamm SC5314 verwendet wurde, zeigt über eine 4448 bp große 5'-flankierende Region von *EFG1* (*BglII* bis ATG) in 63 bp Sequenzunterschiede (Abb. 10).

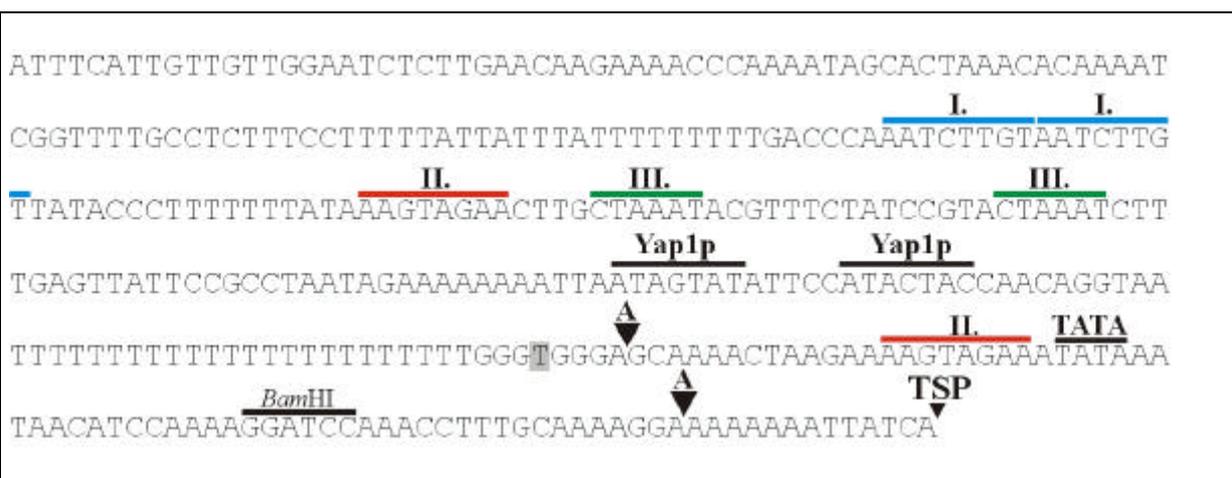
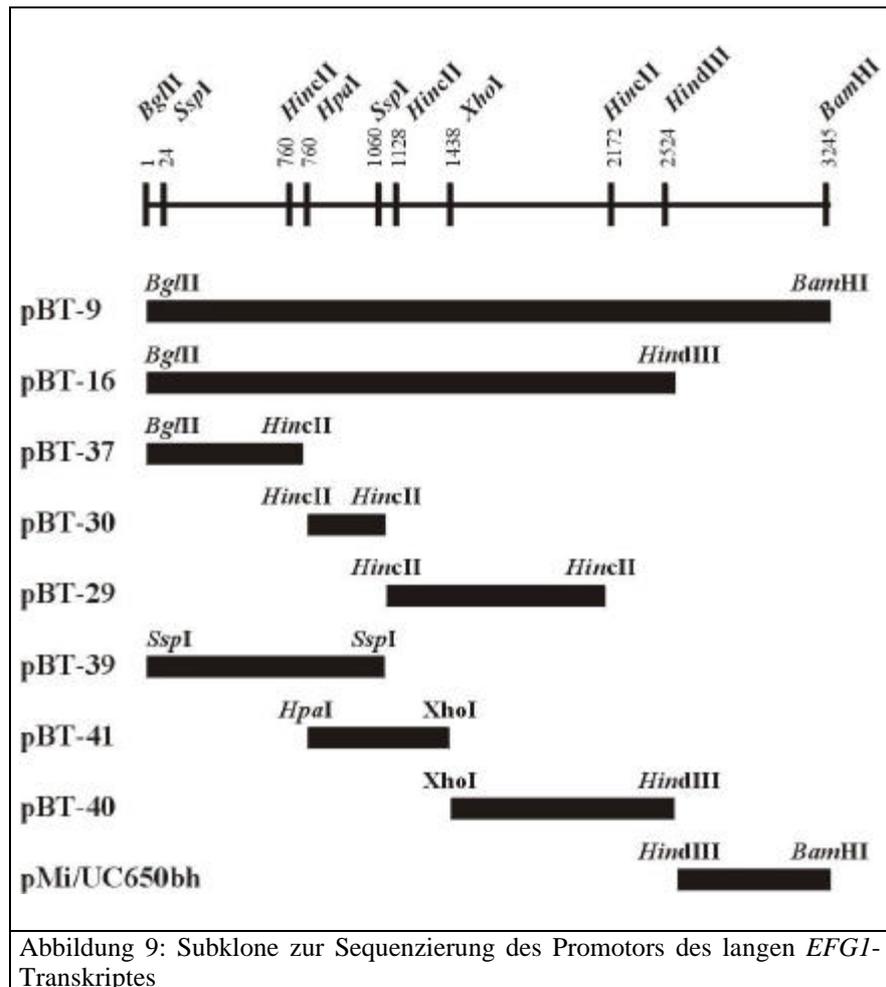


Abbildung 10: Sequenz der 5'-flankierenden Region des Startpunktes des langen *EFG1*-Transkriptes. Dargestellt ist das 3'-Ende des *EFG1*-Hauptpromotors in Stamm ATCC10231. Neben dem Transkriptionsstartpunkt (TSP: -1169) ist die Position der TATA-Box gekennzeichnet. Die *BamHI*-Schnittstelle unterteilt die 5'-flankierende Region von *EFG1* in den Promotor des kurzen Transkriptes (stromabwärts; Weide, 1997) und den Promotor des langen Transkriptes (stromaufwärts). Zusätzlich ist die Position modifizierter Yap1p-Bindemotive (5'-TTACTAA-3') markiert. Hervorgehoben sind ferner drei 6-8 bp große Sequenzwiederholungen (I-III.). In der TATA-Box-Umgebung sind drei in der Sequenz des Stammes SC5314 abweichende Nukleotide markiert (T: grau unterlegt, nicht in SC5314; 2xA: nur in SC5314 an mit Pfeil markierter Position).

3.4 Disruption der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes

Die 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes umfaßt 1169 Basenpaare (3.2.2). Diese außergewöhnliche Größe ließ eine regulatorische Funktion der 5'UTR in der posttranskriptionalen Kontrolle der *EFG1*-Expression vermuten (McCarthy, 1998). Den ersten Schritt zur Identifizierung einer solchen Funktion stellte die Deletion der 5'-untranslatierten Region im *EFG1*-Locus in verschiedenen Stämmen dar.

3.4.1 Disruption in den Stämmen CAI4, CAI8 und BCa14.1

Mittels der sogenannten „URA-Flipper“-Methode (Morschhäuser *et al.*, 1999) wurde in den *C. albicans*-Stämmen CAI4 und CAI8 die 5'UTR des *EFG1*-Locus auf beiden Allelen disruptiert. Der Stamm BCa14.1 trägt eine homozygote *cph1*-Deletion und eine heterozygote *efg1*-Deletion. In diesem Stamm mußte nach FOA-Selektion auf Uridin-Auxotrophie lediglich die 5'UTR des *EFG1*-Locus auf einem Allel disruptiert werden.

Zur homologen Rekombination der Disruptionskassette in den *EFG1*-Locus diente ein 0,9 kb-Fragment aus der 3'-Region des *EFG1*-Hauptpromotors (einschließlich des Transkriptionsstartpunktes) und ein 0,9 kb-Fragment aus der 5'-Region des offenen Leserahmens (einschließlich des Startcodons), welche an die URA-Flipper-Kassette kloniert wurden (Abb. 11; Konstruktion siehe 2.8).

Die Transformanten wurden in Southern-Blot-Analysen auf die Richtigkeit der Integration der Disruptionskassette untersucht (Abb. 11). In positiv getesteten Stämmen wurde über die Induktion der *SAP2p*-abhängigen Expression der Rekombinase die Kassette wieder so herausgeschnitten, daß der Promotor des langen *EFG1*-Transkriptes unmittelbar vor dem offenen Leserahmen von *EFG1* liegt (Abb. 11). Eine Erkennungssequenz für die Rekombinase (Abb.11: FRT) verbleibt jedoch auch nach dem Entfernen der Disruptionskassette zwischen dem Transkriptionsstartpunkt des langen *EFG1*-Transkriptes (Abb. 11: TSP) und dem Startpunkt der Translation (Abb. 11: ATG). Der disruptierte *EFG1*-Locus wird in Abbildung 15 vorgestellt (siehe 3.4.4).

Auf diese Weise wurden folgende Stämme produziert.

- BT1.1/BT1.2 : 5'UTR in einem *EFG1*-Allel disruptiert in Stamm CAI4
- BT2.1/BT2.2 : 5'UTR in einem *EFG1*-Allel disruptiert in Stamm CAI8
- BT3.1/BT3.2 : 5'UTR in beiden *EFG1*-Allelen disruptiert in Stamm CAI4
- BT4.1/BT4.2 : 5'UTR in beiden *EFG1*-Allelen disruptiert in Stamm CAI8
- BT5.1/BT5.2 : 5'UTR in einem *EFG1*-Allel disruptiert in Stamm BCa14.1

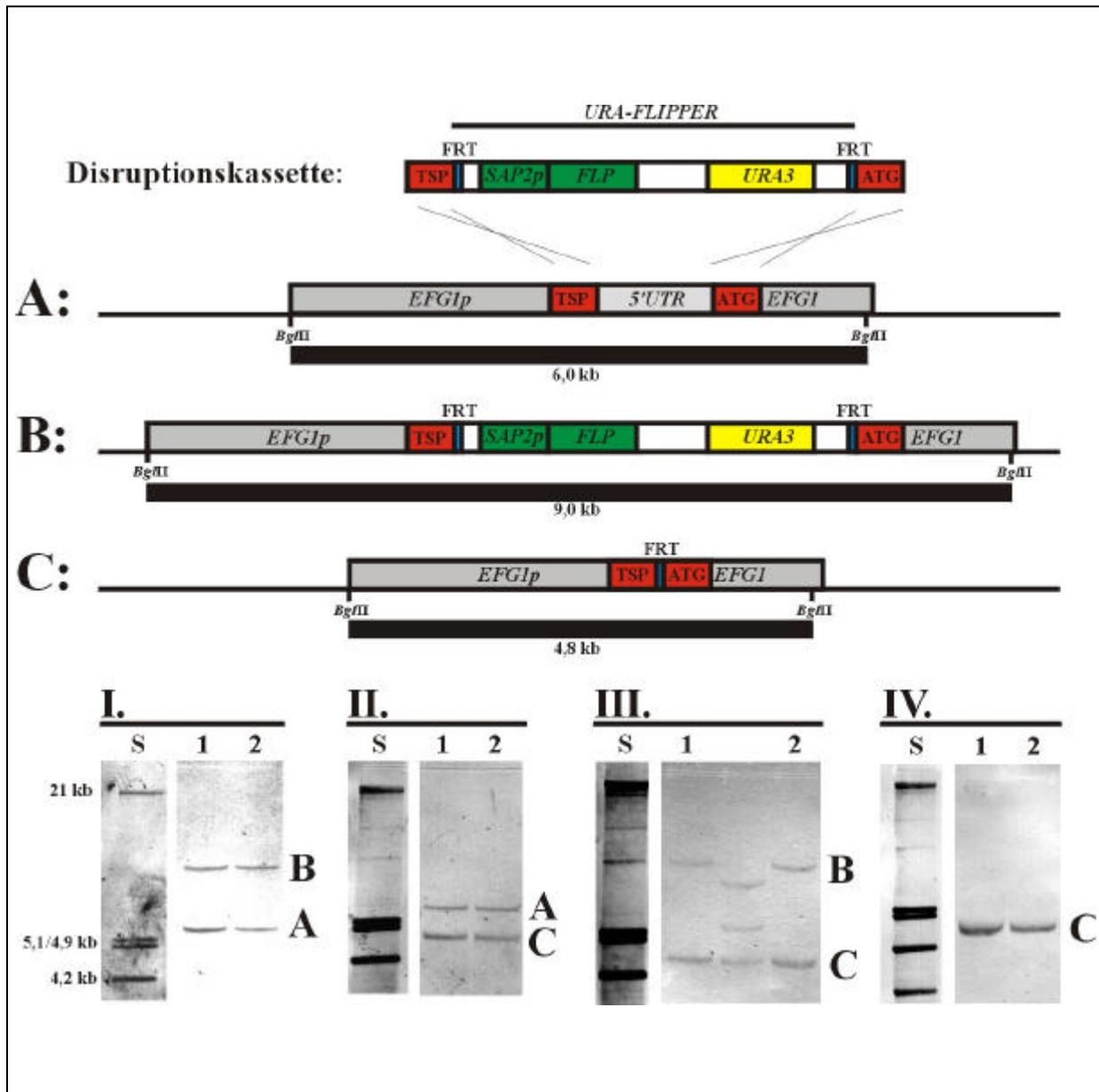


Abbildung 11: Southern-Blot-Analyse der 5'UTR-Disruption

Die Bestandteile der Disruptionskassette sind schematisch dargestellt. Die Rekombinase (*FLP*) steht unter Kontrolle des *SAP2*-Promotors (*SAP2p*). Als Marker dient das *URA3*-Gen. Flankiert wird die Kassette von homologen Bereichen des *EFG1*-Locus (*TSP*, *ATG*). Unter A, B und C sind die drei verschiedenen Situationen im Verlauf der Disruptionsschritte am *EFG1*-Locus schematisch dargestellt. A zeigt die Wildtypsituation, B die Integration der URA-Flipper-Kassette und C die Situation nach dem Herausschneiden der Kassette. Die genomische DNA wurde mit *Bgl*II geschnitten, um die angegebenen Fragmente (A: 6,0 kb; B: 9,0 kb; C: 4,8 kb) mit einer *EFG1*-Sonde (1,3 kb *Nhe*I/*Bgl*II-Fragment aus pUC19/*EFG1*) in der Southern-Analyse nachzuweisen. Dieser Nachweis ist unter I.-IV. an einigen Beispielen dokumentiert. Unter I. (1, 2) wird das Muster bei Integration der Disruptionskassette in einem Allel gezeigt (9,0 kb), unter II. das Muster bei herausgeschnittener Kassette in einem Allel (4,8 kb), unter III. das Muster bei herausgeschnittener Kassette in einem Allel (4,8 kb) und integrierter Kassette im anderen Allel (9,0 kb), unter IV. das Muster bei herausgeschnittener Kassette in beiden Allelen. Die mittlere Spur unter III. zeigt einen Stamm mit nicht korrekter Integration. Als Längenstandard (S) diente *Eco*RI/*Hind*III geschnittene λ -DNA.

3.4.2 Transkriptanalyse in den 5'UTR-Deletionsstämmen

Nach der genomischen Kontrolle der Disruption der 5'UTR über Southern-Blot-Analysen wurden außerdem die *EFG1*-Transkripte der Deletionsstämmen durch einen Northern-Blot analysiert. Da der Promotor des langen Transkriptes durch die Deletion der 5'UTR direkt an den ORF fusioniert worden war, konnte man in den doppelt disruptierten Stämmen nur noch ein verkürztes *EFG1*-Transkript (2,1 kb) erwarten. Untersucht wurde die Gesamt-RNA aller 5'UTR-disruptierten Stämme (Abb. 12).

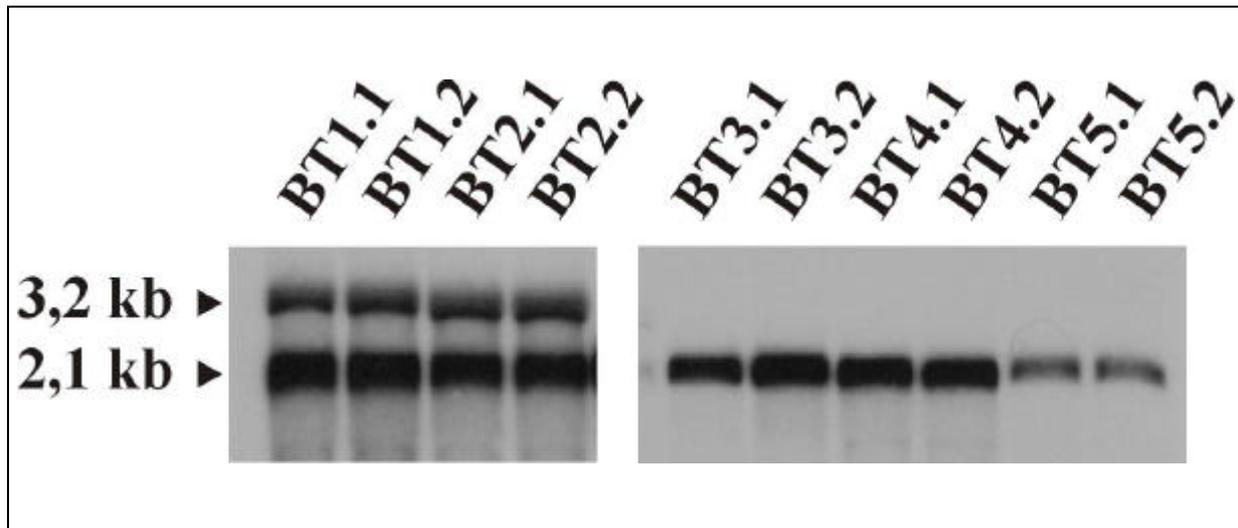


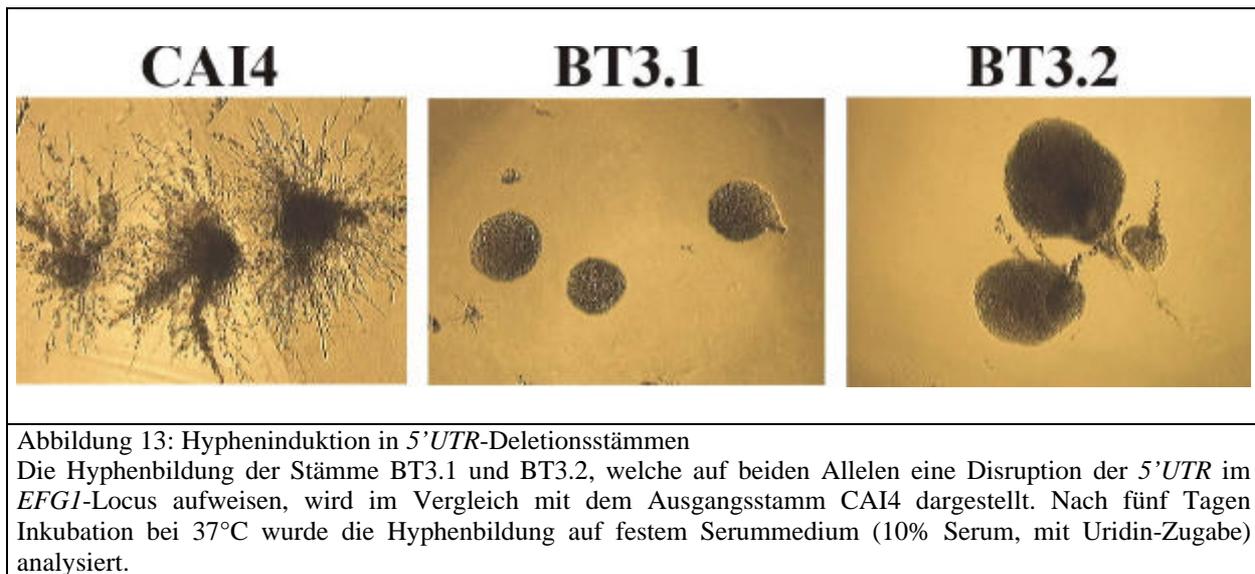
Abbildung 12: Northern-Blot Analyse der 5'UTR-Deletionsstämmen

Die Northern-Blot-Analyse zeigt für die in einem Allel disruptierten Stämme neben dem langen *EFG1*-Transkript (3,2 kb) ein kurzes *EFG1*-Transkript (2,1 kb). Die doppelt disruptierten Stämme zeigen lediglich ein kurzes Transkript (2,1 kb).

Von allen Allelen, auf welchen die 5'UTR disruptiert wurde, wird ein kurzes *EFG1*-Transkript (2,1 kb) exprimiert. In den Stämmen, welche nur in einem Allel disruptiert sind, fällt auf, daß das kurze Transkript in ca. 5fach größerer Menge als das lange Transkript (3,2 kb) nachgewiesen werden konnte. Das schwächere Signal in den Stämmen BT5.1 und BT5.2 resultiert z.T. aus einer geringeren eingesetzten RNA-Menge (Daten nicht gezeigt). Da beide Stämme auf einer heterozygoten *efg1*-Mutante (BCa14.1) basieren, exprimieren sie *EFG1* nur von einem Allel, während in den homozygoten 5'UTR-Deletionsstämmen BT3.1/3.2 und BT4.1/4.2 *EFG1* von zwei Allelen unter Kontrolle des *EFG1*-Hauptpromotors exprimiert wird. Die Transkriptanalyse zeigte somit, daß durch Deletion der 5'UTR der *EFG1*-Transkriptspiegel nicht verringert wurde.

3.4.3 Phänotypen der 5'UTR-Deletion

Als Transkriptionsfaktor spielt Efg1p eine essentielle Rolle in der Regulation des Dimorphismus von *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Daher stand der Einfluß der Disruption der 5'UTR auf die Induktion des Hyphenwachstums im Mittelpunkt des Interesses. Die Deletionsstämmen, welche lediglich ein kurzes Transkript unter der Kontrolle des *EFG1*-Hauptpromotors exprimieren (siehe 3.4.2), wurden auf induzierenden Serum-Platten (10% Serum) vereinzelt und die Hyphenbildung analysiert (Abb. 13, 14).

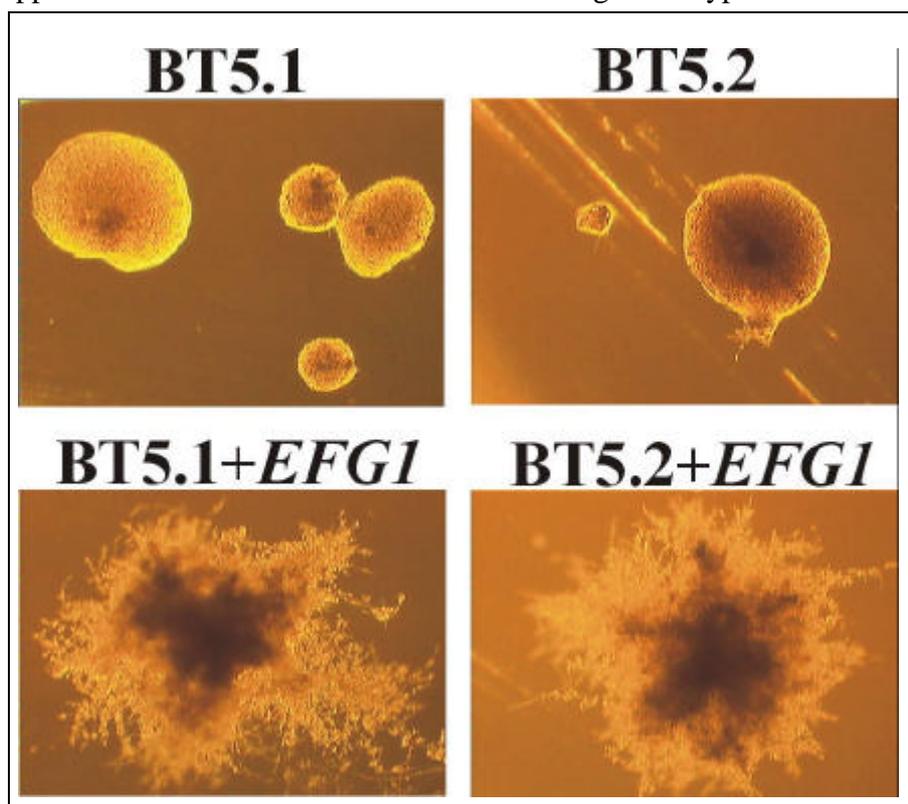


Während die Deletion der 5'UTR auf einem Allel in den Stämmen BT1.1/BT1.2 bzw. BT2.1/BT2.2 keinen nachweisbaren Defekt der Hyphenbildung aufwiesen (Daten nicht gezeigt), zeigten die Doppeldeletionen eine deutliche Einschränkung der Hypheninduktion auf Serummedium

(Abb. 13). Nur vereinzelt wurden Hyphen gebildet (BT3.2). Die Deletion der 5'UTR auf dem einen vollständigen *EFG1*-Allel im Stamm BCa14.1, welcher in einem *EFG1*-Allel und beiden *CPH1*-Allelen disruptiert ist, zeigte auf Serum (10%) einen nahezu totalen Verlust der Hyphenbildung (Abb. 14).

Dieser Defekt konnte durch ein vollständiges *EFG1*-Allel auf einem Plasmid (pBT-49) komplementiert werden (Abb. 14).

Das Ausmaß der Induktion deutet auf eine vollständige Rekonstituierung des Wildtyps.



3.4.4 Einfluß der FRT-Sequenz auf die Expression

Bei der Anwendung der „URA-Flipper“-Methode nach Morschhäuser (1999) verbleibt nach dem Ausschneiden der Disruptionskassette eine Erkennungssequenz (FRT) für die induzierbare Rekombinase am disruptierten Locus. Dabei handelt es sich um folgende 34 bp lange Sequenz: 5'-GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTC-3'.

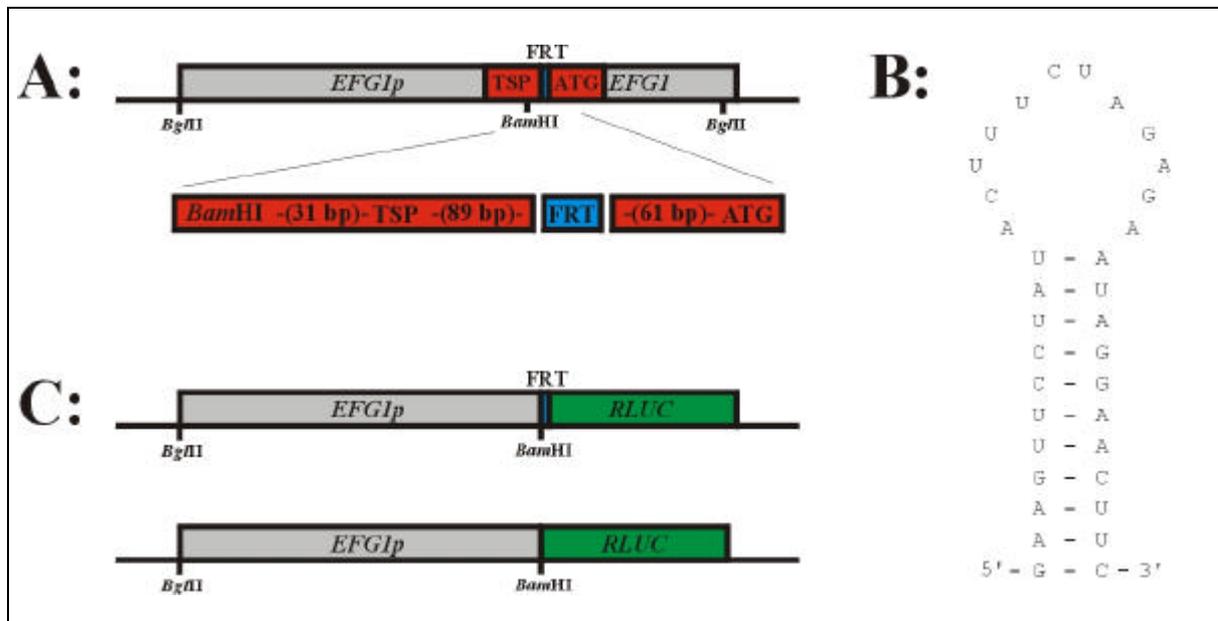


Abbildung 15: Schema des disruptierten *EFG1*-Locus

Unter A wird die Position der FRT-Sequenz am disruptierten *EFG1*-Locus demonstriert (Sequenz siehe 2.8). Ihre potentielle Haarnadelstruktur im *EFG1*-Transkript ist unter B gezeigt. Die Reportergerkonstrukte des Kontrollansatzes mit (pBT-155) und ohne FRT-Sequenz (pBT-100) sind schematisch unter C dargestellt.

Nach der Disruption der 5'UTR befindet sich die FRT-Sequenz 89 bp hinter dem Transkriptionsstartpunkt (Abb. 15, A). Die mRNA enthält daher am 5'-Ende die transkribierte FRT-Sequenz. Aufgrund ihrer Basenfolge ist diese in der Lage, eine „Haarnadelstruktur“ auszubilden (Abb. 15, B), welche in der Translation eine inhibierende Funktion auf den „Scanning“-Prozeß der Ribosomen ausüben könnte (McCarthy, 1998).

Ob die zuvor beschriebenen Hyphendefekte der Stämme mit einer Disruption der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkripts (Abb. 13, 14) lediglich das Resultat einer durch die Haarnadelstruktur der FRT-Sequenz inhibierten Translation des *EFG1*-Transkripts darstellen, wurde durch folgenden Versuchsansatz näher untersucht. Da eine korrekte Expression von *EFG1* aufgrund des fehlenden Efg1p-Antikörpers nicht direkt über die Detektion des Proteins nachweisbar war, wurde ein indirekter Ansatz über die Expression des Reportergens *RLUC* gewählt. Die Situation am *EFG1*-Locus nach der Disruption der 5'UTR wurde dadurch simuliert, daß zwischen dem *EFG1*-Hauptpromotor und dem Reporter *RLUC* die FRT-Sequenz eingefügt wurde (Abb. 15, C). Diese Expressionskassette aus *EFG1p*/FRT/*RLUC* wurde in den Vektor p1367/1, welcher das *URA3*-Gen trägt, kloniert. Das so erhaltene Plasmid pBT-155 wurde ebenso wie das Plasmid pBT-100, welches keine FRT-Sequenz zwischen *EFG1p* und *RLUC* enthält, im *EFG1*-Hauptpromotor mit *HpaI* linearisiert und in den *EFG1*-Locus des Stammes CA14 integriert. Die Luziferase-Aktivität von jeweils zwei Stämmen mit integriertem Plasmid (pBT-100, pBT-155) wurde luminometrisch bestimmt:

pBT-100 (ohne FRT):	0,12 +/- 0,04 RLU/ μ g
pBT-155 (mit FRT):	1,1 +/- 0,01 RLU/ μ g.

Das Konstrukt mit der FRT-Sequenz (pBT-155) zeigte eine gegenüber dem Konstrukt ohne FRT-Sequenz (pBT-100) erhöhte Luziferase-Aktivität. Da beide Konstrukte in das Genom integriert wurden (analog zur Deletionsanalyse 3.7.2.3, Abb.24) und somit in einfacher und konstanter Kopiezahl vorliegen (Daten nicht gezeigt), war in diesem Modell kein inhibierender Einfluß der FRT-Sequenz auf die Expression (Translation) des Reportergens nachweisbar. Die FRT-Sequenz am 5'-Ende des *RLUC*-Transkriptes führte dagegen sogar zu einer Erhöhung der Reporteragenaktivität, möglicherweise über eine Stabilisierung des Transkriptes.

3.5 Überexpression des langen *EFG1*-Transkriptes

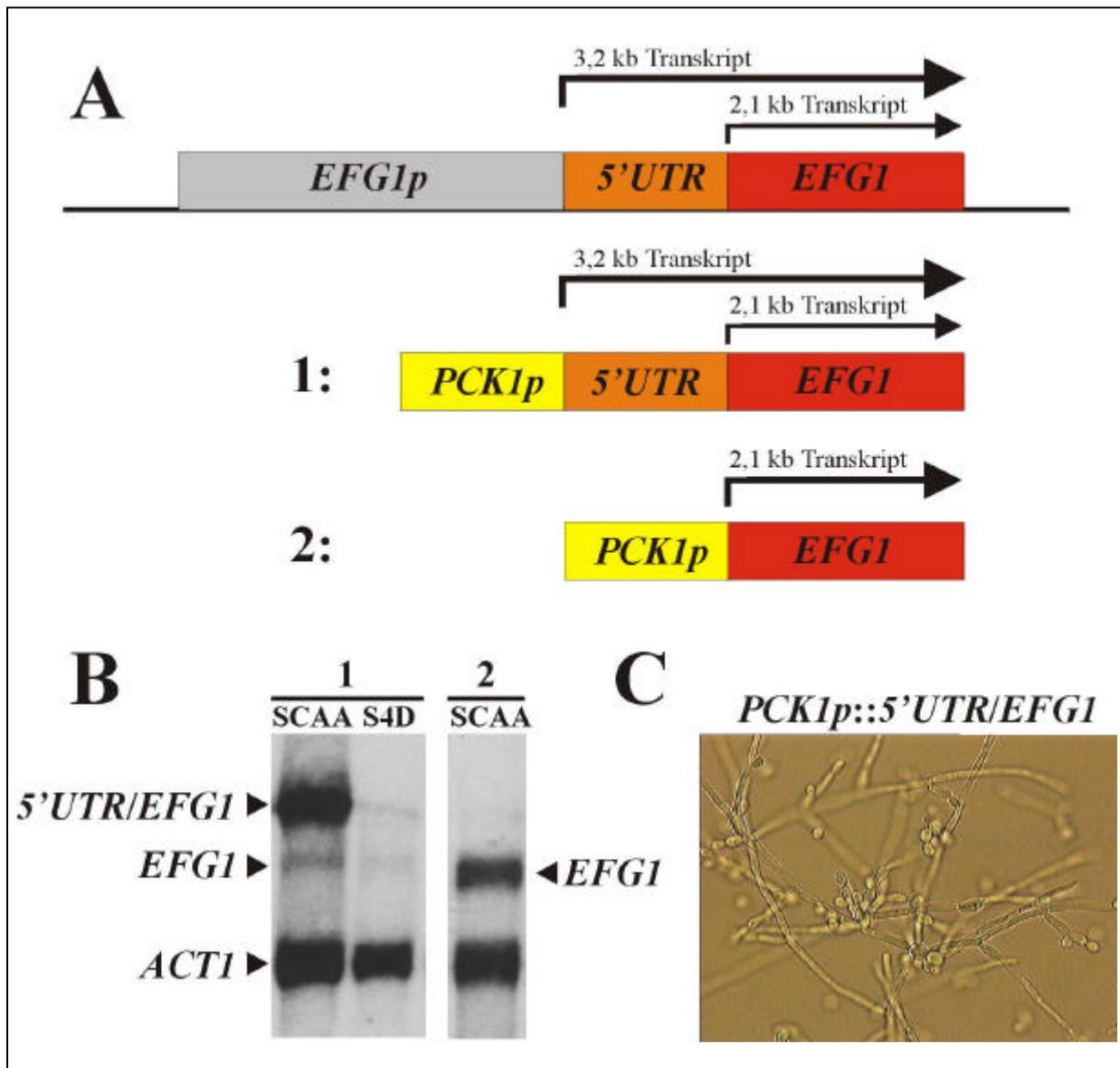


Abbildung 16: Überexpression der *EFG1*-Transkripte

Unter A werden schematisch die beiden *PCK1p*-Fusionen (1: pBT-50, 2: pBI-HAHYD) und die von ihnen exprimierten Transkripte dargestellt. Die Northern-Analyse der *EFG1*-Transkripte (B) erfolgte im *efg1*-Deletionsstamm HLC67. Die Überexpression des langen Transkriptes wurde durch Induktion des *PCK1*-Promotors in SCAA-Medium erreicht. In S4D-Medium wird der *PCK1*-Promotor reprimiert und kein *EFG1*-Transkript exprimiert. Die Überexpression des kurzen Transkriptes erfolgte wiederum in SCAA (2). Die Überexpression des langen Transkriptes in Stamm CAI8 in SCAA-Medium führt zur Ausbildung von Pseudohyphen (C).

Alle bisherigen Überexpressionsexperimente mit *EFG1* waren mit dem kurzen Transkript ohne die *5'UTR* durchgeführt worden (Stoldt et al., 1997). Dabei entstand eine stark elongierte pseudohyphale Wachstumsform. Um den Einfluß der *5'UTR* auf die Bildung dieser Pseudohyphen zu untersuchen, erfolgte eine Fusion des regulierbaren *PCK1*-Promotors an den das lange *EFG1*-Transkript codierenden Bereich (pBT-50). Nach Transformation des Plasmides pBT-50 in den Stamm CAI8 wurde bei allen Transformanten bei Induzierung des *PCK1*-Promotors die Bildung von Pseudohyphen beobachtet (Abb. 16). Somit besitzt die *5'UTR* weder einen aktivierenden noch einen inhibierenden Einfluß auf die Entwicklung von Pseudohyphen.

3.6 *LAC4*-Fusionen der *EFG1*-Promotoren

Zur Analyse der Promotorfunktion der 5'-flankierenden Sequenzen von *EFG1* wurde ein 3,2 kb Fragment stromaufwärts der in Abbildung 10 markierten *Bam*HI-Schnittstelle sowohl direkt als auch in Verbindung mit der *5'UTR* an das Reporter-gen *LAC4* fusioniert (Abb. 17).

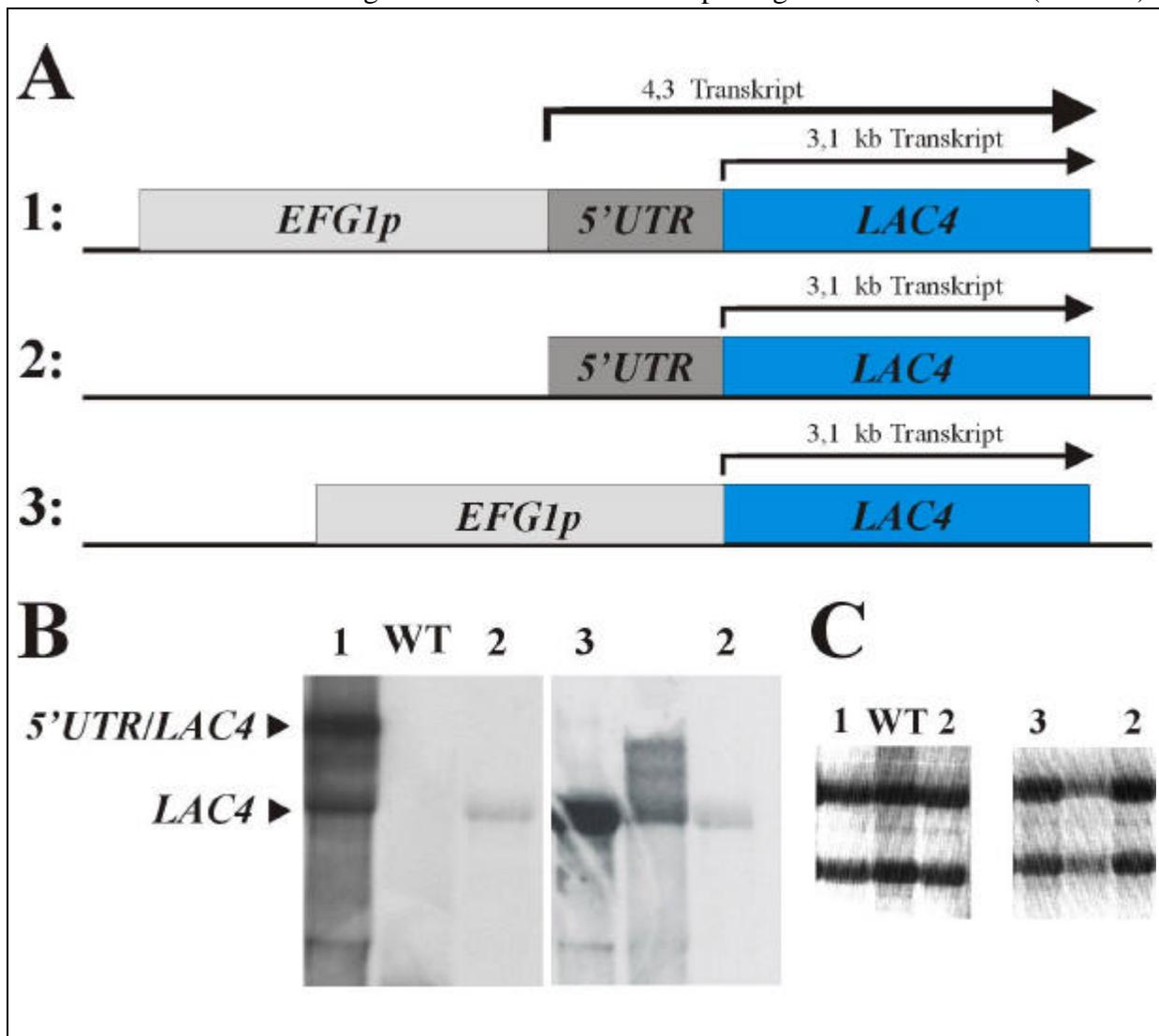


Abbildung 17: *LAC4*-Fusionen der *EFG1*-Promotoren

Unter A ist schematisch die Fusion beider Promotoren gemeinsam an *LAC4* (1: Plasmid pBT-25), die Fusion des Nebenpromotors (hier mit *5'UTR* bezeichnet) an *LAC4* (2: Plasmid pCL76) und die Fusion des Hauptpromotors (hier mit *EFG1*-Promotor bezeichnet) an *LAC4* dargestellt. Diese Plasmide wurden zusammen mit dem Vektor pAPE(2)/ADE in den Stamm CAI8 transformiert und die Zellen in S4D-Medium angezogen. In einer Northern-Analyse (B) wurde ein 4,3 kb großes *LAC4*-Transkript (1) und ein 3,1 kb großes *LAC4*-Transkript (1, 2, 3) detektiert. Als Negativkontrolle wurde der Stamm SC5314 verwendet (WT). Die ribosomale RNA dokumentiert als Mengenstandard gleiche RNA-Mengen (C).

Die Fusion der gesamten Promotorregion mit Haupt- und Nebenpromotor an *LAC4* (pBT-25) führte zur Expression zweier *LAC4*-Transkripte (Abb 17: Spur 1). Während das kürzere Transkript (3,1 kb) der Größe des *LAC4-ORF* entspricht, beinhaltet das lange *LAC4*-Transkript (4,3 kb) die 5'UTR von *EFG1*, da es ebenfalls mit einer Sonde aus der Region der 5'UTR nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte die Fusion des *EFG1*-Hauptpromotors (pBT-34) bei vergleichbaren RNA-Mengen (siehe C) ein deutlich stärkeres Signal als die Fusion des *EFG1*-Nebenpromotors (bzw. der 5'UTR) an *LAC4* (pCL76), wodurch die verschiedenen Expressionsniveaus der beiden *EFG1*-Transkripte widerspiegelt werden (Abb. 5). Der *EFG1*-Nebenpromotor (*Bam*HI bis ATG) auf Plasmid pCL76 beinhaltet zwar den Transkriptionsstart des langen *EFG1*-Transkriptes, jedoch nicht den entsprechenden Hauptpromotor (Abb. 10), so daß kein langes *LAC4*-Transkript (4,3 kb) exprimiert wird. Die von Weide (1997) durchgeführten Expressionsstudien beziehen sich daher ausschließlich auf den *EFG1*-Nebenpromotor

3.7 Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors

Die Expression des langen *EFG*-Transkriptes unterliegt einer autoregulatorischen Repression. Bei episomaler Überexpression von *EFG1* unter der Kontrolle des induzierbaren *PCK1*-Promotors zeigt sich eine deutliche Abnahme des langen *EFG1*-Transkriptes (Sonneborn, 1999). Dieses Phänomen wird in Abbildung 18 dokumentiert. In Spur 1 zeigt sich ausschließlich die *EFG1*-Expression vom genomischen Locus detektiert, da der *PCK1*-Promotor in S4D-Medium nahezu vollständig reprimiert wird (Leuker *et al.*, 1997). Es werden die zwei zuvor beschriebenen *EFG1*-Transkripte (3,2 kb und 2,1 kb) (Abb. 5) beobachtet. Die Induktion (bzw. De-repression) des *PCK1*-Promotors in SCAA-Medium resultiert in einer deutlichen Zunahme des kurzen Transkriptes (Spur 2), welches von dem Plasmid pAPE(2)/ADE exprimiert wird (*PCK1*-Promotor ohne 5'UTR fusioniert an *EFG1*-ORF). Dieses wird von einem nahezu völligen Verschwinden des genomischen langen *EFG1*-Transkriptes begleitet. Bei einer *EFG1*-Überexpression wird somit die genomische Expression des langen *EFG1*-Transkriptes reprimiert.

Zur Untersuchung der negativen *EFG1*-Autoregulation etablierte Weide (1997) ein „Zwei-Plasmid-System“, um regulatorische Domänen des *EFG1*-Nebenpromotors zu identifizieren. Dabei werden in den *C. albicans*-Stamm CAI8 zwei Plasmide transformiert (Abb. 19). Eines trägt zur Überexpression von *EFG1* eine Fusion des regulierbaren *PCK1*-Promotors an den *EFG1*-ORF, das zweite Plasmid beinhaltet die Fusion des *EFG1*-Promotors oder Fragmente desselben an das Reportergen *LAC4*. Auf diese Weise konnte für den Nebenpromotor von *EFG1* eine autoregulatorische Repression um den Faktor 8 bestimmt werden (Weide, 1997). Dieser errechnet sich als Verhältnis der *EFG1p*-abhängigen *LAC4*-Expression in S4D-Medium (keine episomale *EFG1*-Expression) und in SCAA-Medium (*EFG1*-Überexpression)

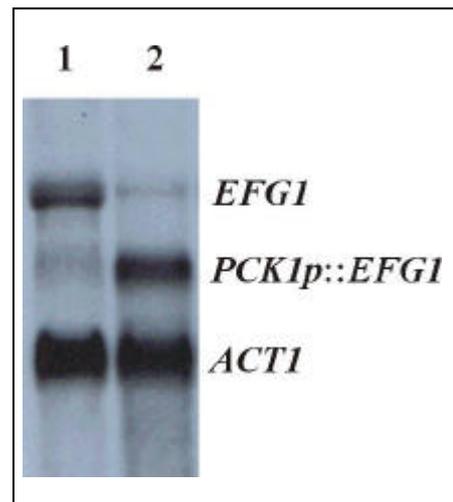


Abbildung 18: Northern-Analyse der *EFG1*-Autoregulation

Der Stamm CAI8 wurde mit dem Plasmid pAPE(2)/ADE und dem Leervektor pBT-3a transformiert und in S4D (1) und SCAA (2) angezogen. Als Mengenstandard dient das *ACT1*-Transkript.

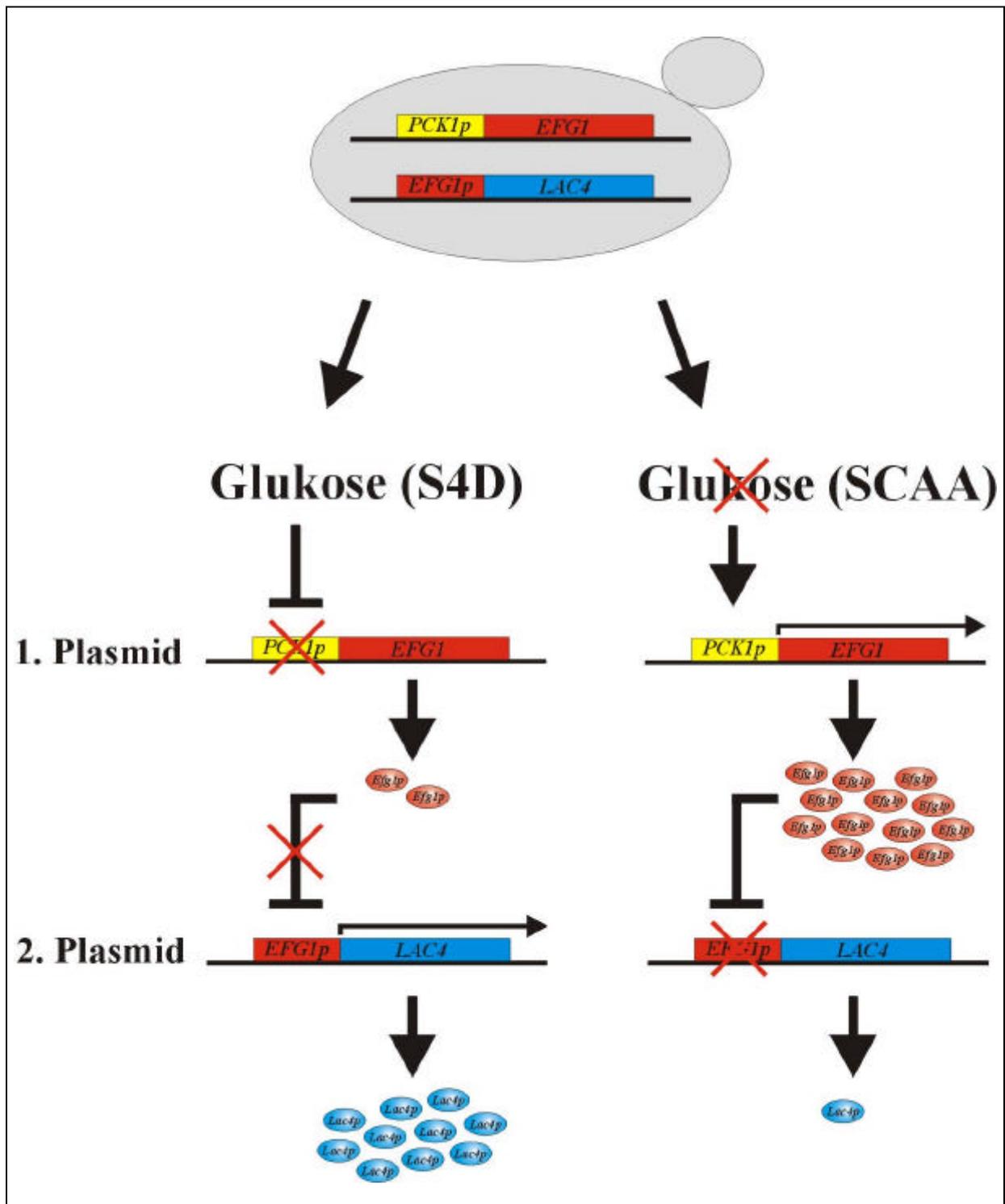


Abbildung 19: „Zwei-Plasmid-Modell“ der *EFG1*-Autoregulation

In den *C. albicans*-Stamm CAI8 werden zwei Plasmide transformiert. Das erste Plasmid beinhaltet eine Fusion des *PCK1*-Promotors mit *EFG1*, das zweite Plasmid eine Fusion des *EFG1*-Promotors mit dem Reportergen *LAC4*. In glukosehaltigem Medium (S4D) wird der *PCK1*-Promotor reprimiert, so daß nur eine geringe episodale *EFG1*-Expression (zusätzlich zur genomischen *EFG1*-Expression) erfolgt. Ein niedriger Efg1p-Spiegel vermittelt keine Repression des *EFG1*-Promotors, so daß unter seiner Kontrolle eine ungehinderte Expression des Reportergens *LAC4* stattfindet. In glukosefreiem Medium (SCAA) bewirkt die Derepression bzw. Induktion des *PCK1*-Promotors eine Überproduktion von Efg1p. Durch den hohen Efg1p-Spiegel erfolgt eine Repression des *EFG1*-Promotors, die sich in einer verminderten Expression des Reportergens manifestiert. Die autoregulatorische Repression berechnet sich als Quotient aus Aktivität des Reportergens ohne und mit Überproduktion von Efg1p.

3.7.1 Northern-Analyse der Autoregulation der *EFG1*-Promotoren

Mit dem „Zwei-Plasmid-Systems“ konnte bereits gezeigt werden, daß die Autoregulation des Nebenpromotors auf Transkriptionsebene stattfindet. Daher sollte getestet werden, ob auch die Abnahme des langen *EFG1*-Transkriptes bei *EFG1*-Überexpression auf Transkriptionsebene reguliert wird (Abb. 18).

Die Fusion der gesamten Promotorregion (Haupt- und Nebenpromotor) an *LAC4* führte zur Expression zweier *LAC4*-Transkripte, so daß die Repression beider Promotoren gleichzeitig untersucht werden konnte.

In Abbildung 20 zeigt sich bei induzierter *EFG1*-Überexpression in SCAA-Medium (Spur 2) im Vergleich zu fehlender Überexpression (Spur 1) eine deutliche Abnahme des langen *LAC4*-Transkriptes (4,3 kb), welches die 5'UTR enthält und unter Kontrolle des *EFG1*-Hauptpromotors exprimiert wird. Die Menge des kleinen Transkriptes nimmt dagegen in geringerem Maße ab.

Die Kontrolle mit einem Leervektor ohne *EFG1*-Überexpression (Spur 3, 4) zeigt für beide *LAC4*-Transkripte keine Abnahme (Spur 4). Als zusätzliche Kontrolle wurde die genomische *PCK1*-Expression analysiert. In glukosefreiem Medium wird mit und ohne Überexpression von *EFG1* (Spur 2 und 4) *PCK1* exprimiert. Somit repräsentiert die Überproduktion von Efg1p nicht unspezifisch die Transkription von Genen (z.B. *ACT1*, *PCK1*), sondern spezifisch die *EFG1*-Expression.

Zusammenfassend wurde durch das „Zwei-Plasmid-System“ bestätigt, daß die autoregulatorische Repression des genomischen *EFG1*-Locus bei Überproduktion von Efg1p (Abb. 18) über die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors vermittelt wird.

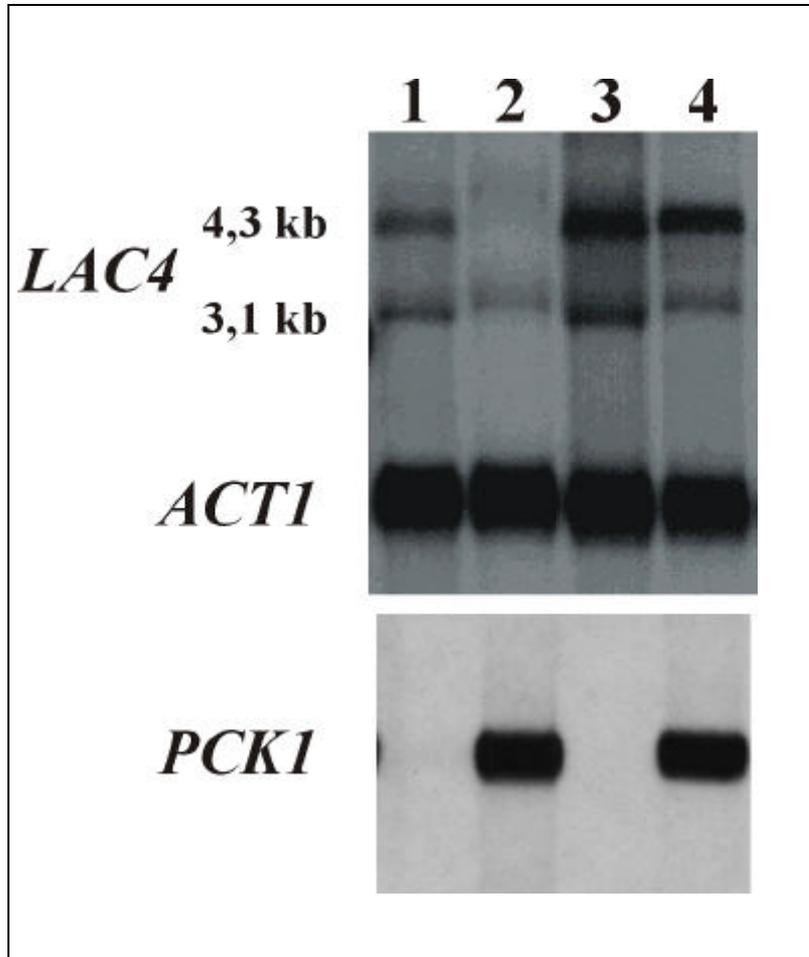


Abbildung 20: Northern-Analyse der Autoregulation im „Zwei-Plasmid-System“

Die *EFG1p*-abhängige *LAC4*-Expression bei episomaler *EFG1*-Überexpression wurde analysiert. Der Stamm CAI8 wurde gleichzeitig mit dem Plasmid pBT-25 (Fusion der gesamten *EFG1*-Promotorregion an *LAC4*; Abb. 17) und mit dem Plasmid pAPE(2)/ADE zur *EFG1*-Überexpression (Spur 1 und 2) oder dem leeren Kontrollvektor pBT-4 (Spur 3 und 4) transformiert. Die Transformanten wurden in S4D (1, 3) und SCAA (2, 4) angezogen. Das lange *LAC4*-Transkript (4,3kb) steht unter Kontrolle des *EFG1*-Hauptpromotors, das kurze *LAC4*-Transkript (3,1kb) steht unter Kontrolle des *EFG1*-Nebenpromotors. Zur Kontrolle der Spezifität der *EFG1*-Autoregulation wurde die *ACT1*- und die *PCK1*-Expression analysiert. *PCK1* wird durch Glukose repräsentiert (1, 3) und in glukosefreiem Medium induziert (2, 4).

3.7.2 Deletionsanalyse des *EFG1*-Hauptpromotors

Im „Zwei-Plasmid-System“ sinkt der *LAC4*-Transkriptspiegel bei *EFG1*-Überexpression (Abb. 20), so daß angenommen werden kann, daß der *EFG1*-Hauptpromotor autoreguliert wird. Dieses Phänomen wurde durch Deletionsstudien in verschiedenen Testsystemen charakterisiert.

3.7.2.1 *LAC4* als episomal exprimiertes Reportergen

Im „Zwei-Plasmid-System“ kann die Kopiezahl der Plasmide schwanken. Um die Lac4p-Aktivität zuverlässig bestimmen zu können, wurden die Transformanten auf X-Gal-Platten auf eine ausreichende β -Galaktosidase-Aktivität vorselektioniert. Nur solche Transformanten, welche nach 3-4 Tagen eine Blaufärbung zeigten, kamen im Test der Autoregulation zum Einsatz. Dieses Vorgehen ist berechtigt, da die autoregulatorischen Repressionswerte bei Transformanten mit verschiedenen *LAC4*-Expressionswerten keine signifikanten Unterschiede zeigten (siehe Anhang I). Trotz der Vorselektion der Transformanten auf X-Gal-Platten variieren die absoluten Werte der β -Galaktosidase-Aktivität in S4D-Medium von 2,5 bis 0,0009 RLU/ μ g, in SCAA-Medium von 0,29 bis 0,00008 RLU/ μ g, wobei die Repressionswerte aber sehr ähnlich waren (Anhang I). Die Reportergenaktivität von Transformanten ohne Blaufärbung war in den meisten Fällen nicht mehr im Enzymtest nachweisbar.

Es sollte getestet werden, ob die Deletion cis-regulatorischer Domänen zu einer Abnahme der autoregulatorischen Repression führt. Um auszuschließen, daß eine solche Abnahme aus einer zufällig geringeren *EFG1*-Überexpression resultiert (variable Kopiezahl des Plasmides), wurde über eine lange Induktionszeit des *PCK1*-Promotors (24 h) eine maximale Überexpression auf vergleichbarem Niveau angestrebt. Bei kürzerer Induktionszeit (8 h) wurde lediglich eine ca. 2-3fache Repression des *EFG1*-Hauptpromotors bestimmt (Daten nicht gezeigt). Diese stellte jedoch sowohl aufgrund erheblicher Schwankungen als auch wegen des niedrigen Repressionsniveaus keine ausreichende Basis für die Deletionsanalyse dar. Das Ausmaß der durch *EFG1*-Überexpression ausgelösten Pseudohyphenbildung diente als zusätzlicher „Gradmesser“ der *Efg1p*-Überproduktion.

Zur Kontrolle der Spezifität des Autoregulationsphänomens für den *EFG1*-Promotor wurde zusätzlich zur Analyse der *PCK1*-Expression (Abb. 20) der *ACT1*-Promotor in Fusion mit dem Reportergen *LAC4* im „Zwei-Plasmid-Modell“ getestet. Unter *EFG1*-Überexpression und der durch ihr verursachten Pseudohyphenbildung wurde keine Repression, sondern eine konstante Aktivität des *ACT1*-Promotors beobachtet (Daten nicht gezeigt).

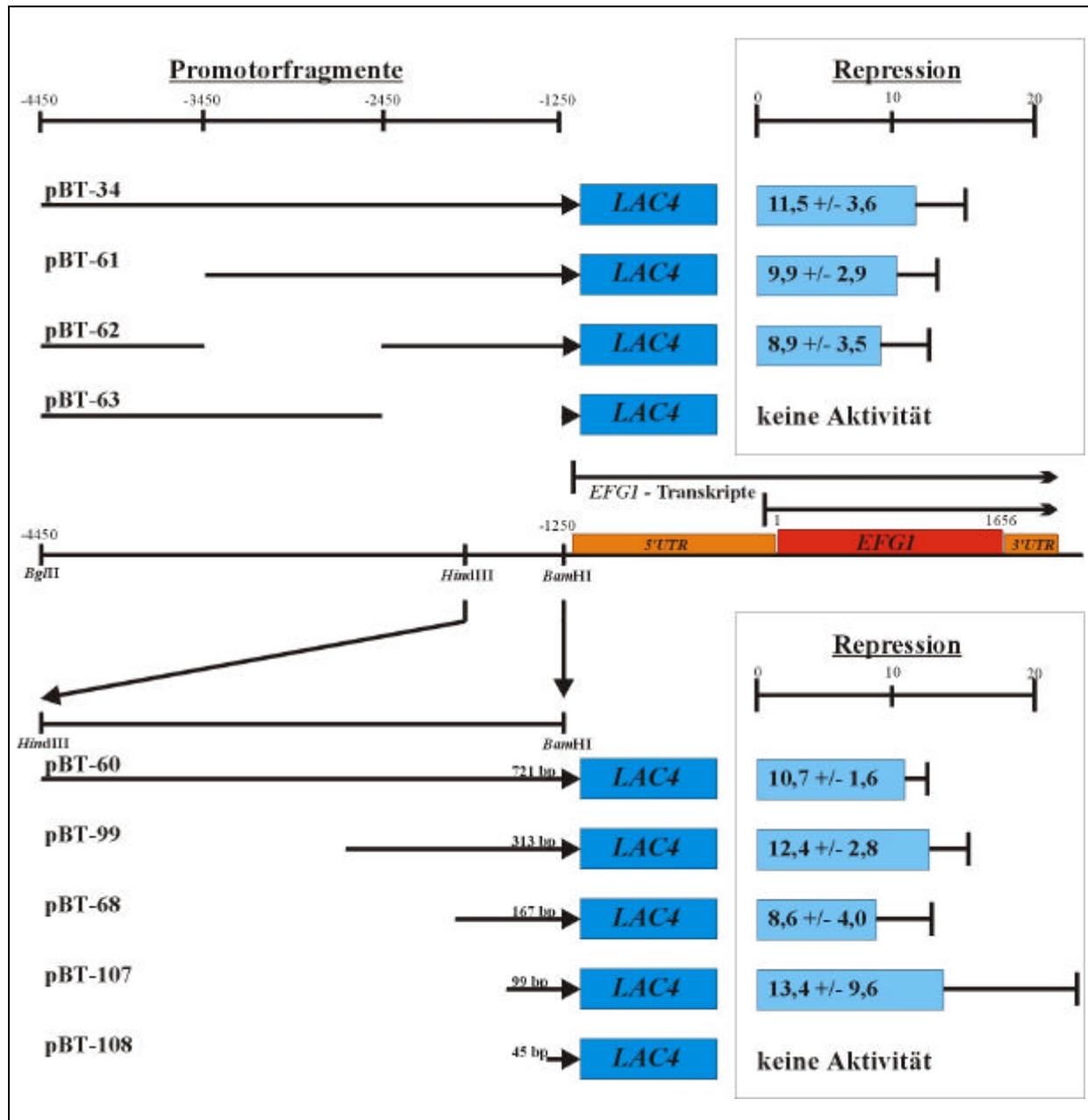


Abbildung 21: Deletionsanalyse des *EFGI*-Hauptpromotors im „Zwei-Plasmid-System“

Auf der linken Seite der Abbildung sind die verwendeten Promotorfragmente schematisch gezeigt, welche direkt an *LAC4* fusioniert wurden; auf der rechten Seite ist die korrespondierende autoregulatorische Repression im Enzymtest gezeigt, welche anhand von mindestens drei verschiedenen Transformanten in unabhängigen Tests ermittelt wurde (Anhang I). In der Mitte der Abbildung wird die Lage der Promotorfragmente am *EFGI*-Locus verdeutlicht. Zusätzlich sind die Namen der verwendeten Reporterplasmide am linken Rand vermerkt. Alle Promotorfragmente reichen bis zur *Bam*HI-Schnittstelle.

Der komplette *EFGI*-Hauptpromotor (pBT-34) zeigte im „Zwei-Plasmid-Modell“ eine 11,5fache Repression der β -Galaktosidase-Aktivität bei Überproduktion von Efg1p (Abb. 21). Die ersten drei Deletionen (pBT-61, pBT-62, pBT-63) dienen dazu, den für die Autoregulation essentiellen Bereich des Promotors einzuengen. Während die beiden distalen Deletionen (pBT-61, pBT-62) eine dem vollständigen Promotor vergleichbare autoregulatorische Repression (9,9 +/- 2,9; 8,9 +/- 3,5) zeigten, führte die Deletion des proximalen Bereiches (-2450 bis -1250; Die Zahlen beziehen sich auf das Startcodon ATG.), welche auch die TATA-Box umfaßt, zu keiner meßbaren Reporteraktivität. Da im distalen

Bereich (-4450 bis -2450) keine funktionalen Regionen lokalisiert zu sein scheinen, konzentrierten sich die weiteren Deletionsschritte auf den proximalen Bereich. Eine Deletion, welche nur noch 721 bp stromaufwärts der zuvor erwähnten *Bam*HI-Schnittstelle enthält (pBT-60), wies dieselbe Repression auf (10,7 +/- 1,6) wie der gesamte Promotor in pBT-34. Eine weitere Verkürzung des Promotors auf 313 bp (pBT-99) führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Autoregulation (12,4 +/- 2,8). Ein 167 bp-Fragment (pBT-68) zeigte eine leicht reduzierte autoregulatorische Hemmung (8,6 +/- 4,0), welche jedoch nicht signifikant von der Wildtyp-Repression (11,5 +/- 3,6) abwich. Die folgende Verkürzung auf nur 99 bp (pBT-107) verhielt sich ähnlich (13,4 +/- 9,6). Die absoluten Werte der Lac4p-Aktivität waren bei allen Deletionen vergleichbar und zeigten keinen Einfluß auf die Repressionswerte.

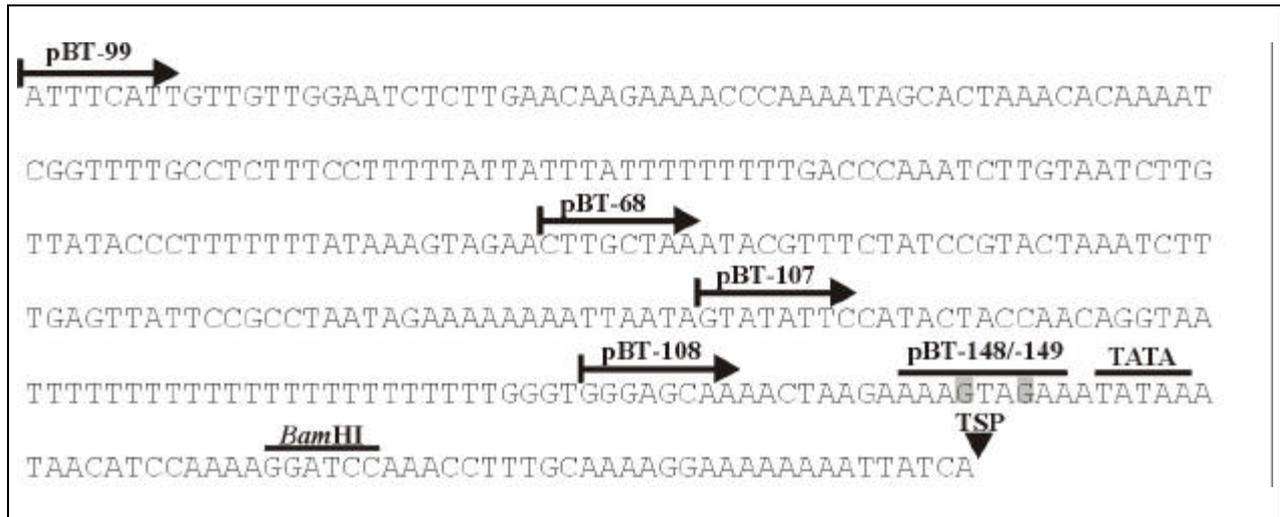


Abbildung 22: Deletionen des *EFGI*-Hauptpromotors

Die durch Pfeile gekennzeichneten verkürzten Promotorfragmente (Angegeben sind die Plasmidnamen.) reichen jeweils bis zur *Bam*HI-Schnittstelle. Die Plasmide pBT-148/-149 enthalten eine Deletion der markierten 9 bp, welche in das Plasmid pBT-68 eingefügt wurde. Die beiden G-Nukleotide (grau unterlegt) vor der TATA-Box wurden in T-Nukleotide im Plasmid pBT-34 mutagenisiert (pBT-120/-121). TSP kennzeichnet den Startpunkt des langen *EFGI*-Transkripts.

Die Verkürzung des Promotors auf nur noch 45 bp (pBT-108) hatte jedoch einen vollständigen Verlust der β -Galaktosidase-Aktivität zur Folge. Obgleich dieses Fragment noch die TATA-Box enthält, konnte im Enzymtest keine Aktivität und damit auch keine Repression gemessen werden. Unter ca. 150 Transformanten mit dem Plasmid pBT-108 konnte auch nach längerer Lagerung bei 4°C keine β -Galaktosidase-Aktivität über eine Blaufärbung der Kolonien nachgewiesen werden. Daher wurden einige Transformanten zufällig ausgewählt und auf ihre Reporterogenaktivität im Enzymtest untersucht. Diese lag jedoch unter der Nachweisgrenze.

Da eine weitere Verkürzung des Promotors nicht ohne völligen Verlust der Reporterogenaktivität möglich war, erfolgten gezielte Deletionen bzw. Basenaustausche an potentiellen Bindestellen aus dem Bereich unmittelbar vor der TATA-Box (Abb. 22). Weder der G-T-Austausch auf den Plasmiden pBT-120/-121 (Repression: 17,2 +/- 5,6) noch die 9 bp-Deletion auf den Plasmiden pBT-148/-149 (Repression: 9,0 +/- 7,1) wiesen auf eine autoregulatorische Funktion dieses Bereiches hin.

Zusammenfassend konnte mit dem „Zwei-Plasmid-Modell“ der für die Autoregulation des *EFGI*-Hauptpromotors essentielle Bereich auf die 99 bp große Sequenz (pBT-107) stromaufwärts der *Bam*HI-Schnittstelle eingegrenzt werden. Eine weitere Eingrenzung (45 bp, pBT-108) führte zu einem Verlust der Reporterogenaktivität.

3.7.2.2 *LAC4* als integriertes Reportergen

Parallel zur Untersuchung der Autoregulation des Hauptpromotors im „Zwei-Plasmid-Modell“ sollten einige Deletionen auch integriert werden, um den Einfluß einer variablen Kopiezahl des Reporterplasmides auf die *LAC4*-Expression auszuschließen. Die Plasmide pBT-34, pBT-68 und pBT-107 wurden zu diesem Zweck in der *ARS2*-Sequenz (Cannon *et al.*, 1990) mit *PmlI* linearisiert und zusammen mit dem *EFG1*-Überexpressionsplasmid pAPE(2)/ADE in den Stamm CAI8 transformiert. Die Integration der Reporterplasmide wurde in einer Southern-Blot-Analyse untersucht. Die genomische DNA jeweils vier verschiedener Transformanten wurde mit *HpaI/BglIII* geschnitten und gleichzeitig mit einer *EFG1*-Sonde und einer *LAC4*-Sonde analysiert (Abb. 23).

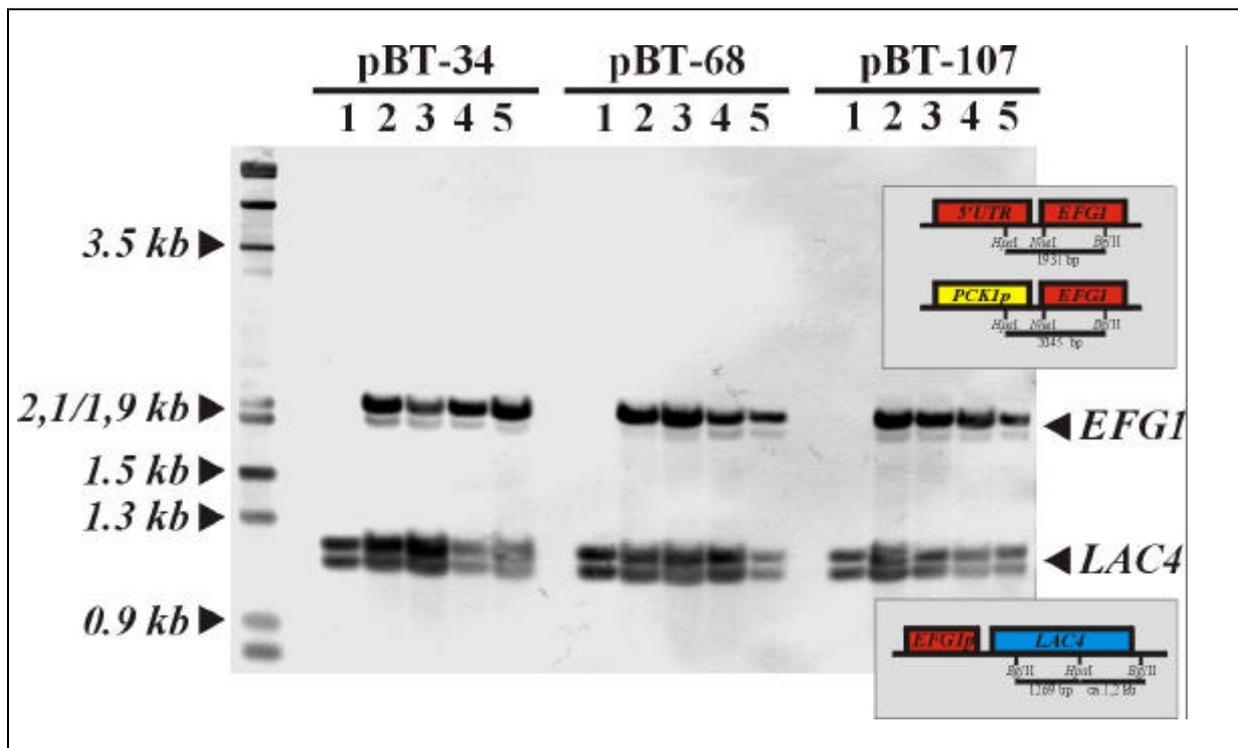


Abbildung 23: Southern-Analyse integrierter *LAC4*-Reporterplasmide

Die linearisierten Reporterplasmide wurden zusammen mit pAPE(2)/ADE in CAI8 transformiert und ihre genomische DNA nach Restriktion mit *PmlI* mit einer *EFG1*-Sonde (1,3 kb *NheI/BglIII*-Fragment aus pUC19/*EFG1*) und einer *LAC4*-Sonde (1,2 kb *HpaI/BglIII*-Fragment aus pRS-*LAC4*) analysiert. In der ersten Spur (1) ist als Kontrolle jeweils nur Plasmid-DNA aufgetragen. Die Spuren 2-5 enthalten die genomische DNA (*HpaI/BglIII*) der Transformanten (siehe Text). Als Größenstandard diente *EcoRI/HindIII* geschnittene λ -DNA.

Mit der *EFG1*-Sonde werden zwei Signale detektiert. Die größere Bande (2045 bp) resultiert aus dem Überexpressionsplasmid pAPE(2)/ADE, während die kleinere Bande (1931 bp) das genomische *EFG1*-Signal darstellt. Die zwei *LAC4*-Signale entstehen durch die Verwendung von zwei Fragmenten ähnlicher Größe (1269 bp, ca. 1,2 kb) als *LAC4*-Sonde. Der Vergleich der Signalintensität der *LAC4*-Signale unterschiedlicher Transformanten zeigt trotz ähnlich starker *EFG1*-Signale z.T. erhebliche Unterschiede (z.B. pBT-34: Spur 3 und 4). Daraus kann geschlossen werden, daß die Reporterplasmide nicht in allen Fällen in einer Kopie integriert wurden. Sie könnten in mehreren Kopien integriert sein.

Der Ansatz der Integration der *LAC4*-Konstrukte über die Transformation in der *ARS2*-Sequenz linearisierter Plasmide garantiert daher nicht, die Variabilität der Kopiezahl des Reportergens zu vermeiden.

3.7.2.3 *RLUC* als integriertes Reportergen

Die Minimierung des *EFGI*-Promotors auf 45 bp im Plasmid pBT-108 (Abb. 21) führte dazu, daß keine *LAC4*-Aktivität mehr nachweisbar war. Da jedoch die vollständige Autoregulation durch einen minimalen Promotor (99 bp) vermittelt wird (pBT-107) und für die exakte Identifizierung funktioneller Regionen weitere Deletionen unerlässlich sind, wurde das bereits für *C. albicans* etablierte Reportergen *RLUC* aus *Renilla reniformis* für weitergehende Deletionen des minimalen *EFGI*-Promotors eingesetzt. Bei Integration einer Kopie von *RLUC* in das Genom von *C. albicans* kann die Aktivität der kodierten Luziferase luminometrisch nachgewiesen zu werden (Srikantha *et al.*, 1996). Somit bot dieser Ansatz die Möglichkeit, sowohl die nicht ausreichende Aktivität der von *LAC4* kodierten β -Galaktosidase als auch die variable Kopiezahl des Reportergens im „Zwei-Plasmid-Modell“ zu umgehen.

Der vollständige *EFGI*-Hauptpromotor aus Plasmid pBT-34 sowie einige Deletionen wurden an *RLUC* fusioniert und in einen Vektor ohne *ARS*-Sequenz (p1367/1) kloniert. Nach Linearisierung der Plasmide im *EFGI*-Promotor (Restriktion mit *HpaI*) wurden sie transformiert und auf diese Weise die Reportergenkonstrukte in den *EFGI*-Promotor integriert. Die Überprüfung der Integration in den Stamm CAI8 wird an einem Beispiel in Abbildung 24 gezeigt. Nach Restriktion der genomischen DNA mit *HindIII* erfolgte in Southern-Analysen die Detektion des integrierten *EFGI*-Promotors mit einer *EFGIp*-Sonde (1199 bp *HindIII*-Fragment aus pBT-48). Bei der Integration des Plasmides pBT-150 bestätigte z.B. die Detektion eines 2863 bp-Fragmentes die korrekte Integration der Reportergenfusion (Abb. 24). Als ursprüngliches genomisches Signal wurden neben einem erwarteten 1199 bp-Fragment zwei weitere Signale (ca. 5,1 kb und 3,5 kb) detektiert, welche jedoch auch im untransformierten Stamm CAI8 auftraten und daher den Hintergrund darstellen.

In die positiv getesteten Integrierten wurde das *EFGI*-Überexpressionsplasmid pAPE(2)/ADE transformiert. Analog zum β -Galaktosidase-Test erfolgte dann über die Messung der *EFGIp*-abhängigen Luziferase-Aktivität mit und ohne *EFGI*-Überexpression eine Analyse der autoregulatorischen Repression in mehreren unabhängigen Transformanten.

Die exakte Position der getesteten Deletionen ist in Abbildung 25 gekennzeichnet. Da für die Integration der Reportergenkonstrukte in den genomischen *EFGI*-Locus ein Teil des *EFGI*-Promotors benötigt wird, reichen alle Deletionen nur bis zur *XmnI*-Schnittstelle (Abb. 25). Der 5'-flankierende Bereich dieser Position besitzt nach den Ergebnissen der *LAC4*-Deletionsanalyse (siehe 3.7.2.1) in der Autoregulation des *EFGI*-Hauptpromotors keine Funktion.

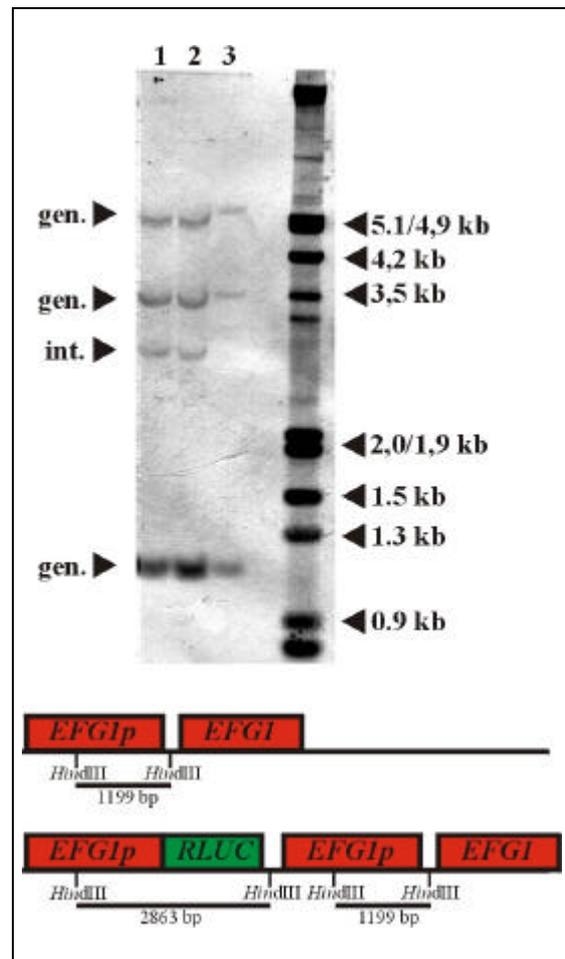


Abbildung 24: Southern-Analyse der Integration der *RLUC*-Fusionen

Neben zwei Integrierten mit dem Plasmid pBT-150 (1, 2) wurde der Stamm CAI8 (3) analysiert (siehe Text). Die Fragmente des *EFGI*-Locus ohne und mit integriertem *RLUC*-Gen sind schematisch dargestellt. Als Größenstandard diente *EcoRI/HindIII*-geschnittene λ -DNA. (*EFGIp*: *EFGI*-Hauptpromotor)

Als Negativkontrolle der Luziferase-Aktivität wurde der *RLUC*-ORF ohne Promotor auf einem Plasmid (pBT-69) in den Stamm CAI4 transformiert. Alle untersuchten Transformatanten zeigten im Enzymtest keine Luziferase-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

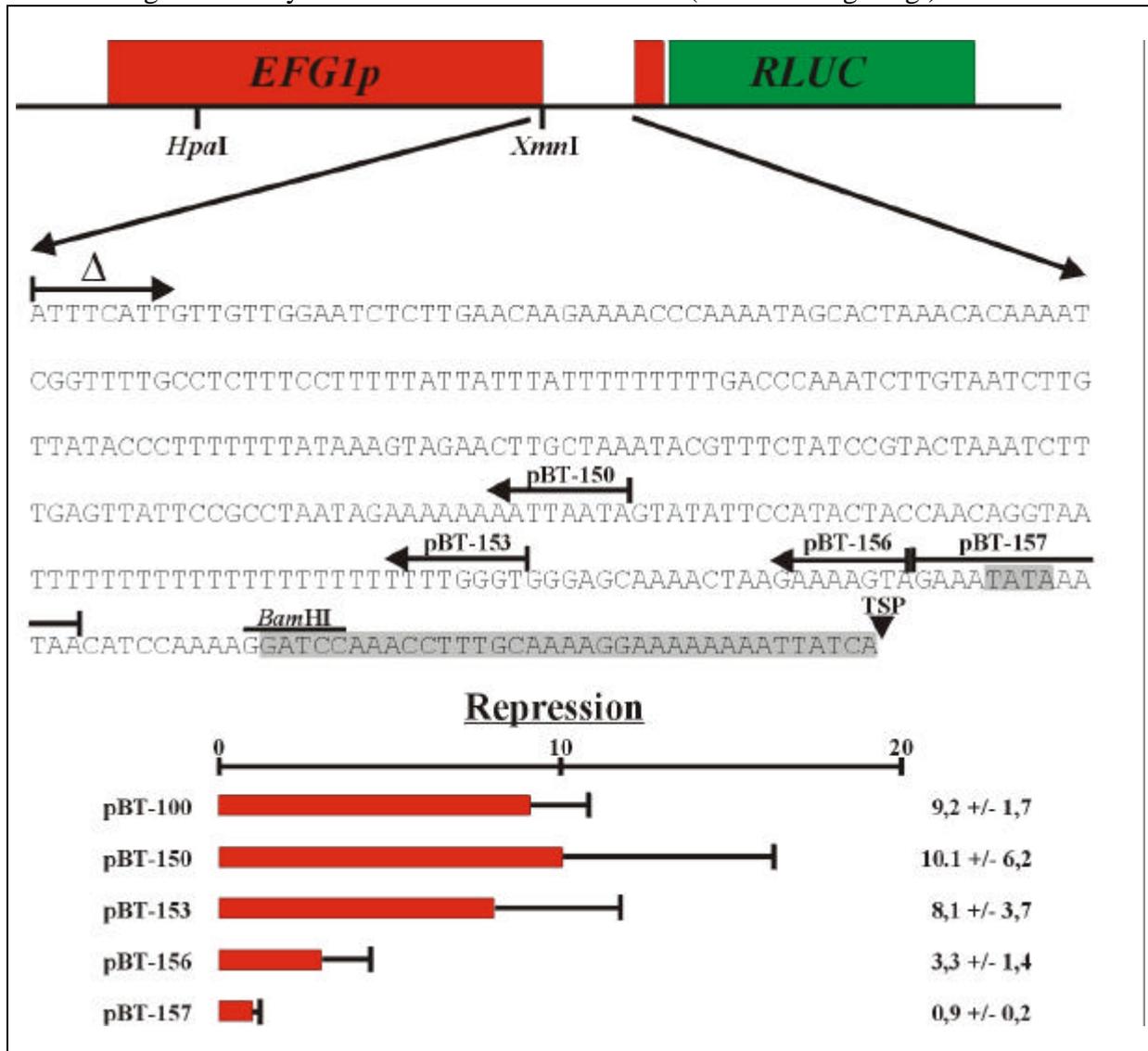


Abbildung 25: Deletionen des *EFG1*-Hauptpromotors im *RLUC*-Reportersystem

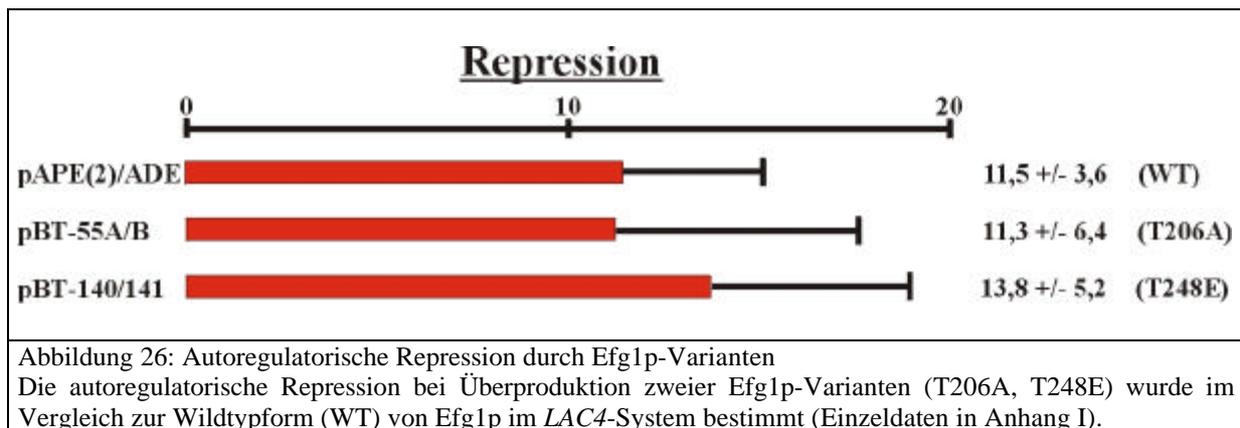
Zur Integration in den *EFG1*-Locus wurden die Reporterkonstrukte im 5'-Bereich des Hauptpromotors linearisiert (*HpaI*). Die Deletionen erfolgten nur im 3'-Bereich des Promotors. Sie reichen jeweils von den mit den Plasmidnamen bezeichneten Pfeilen bis zu dem mit Δ markierten Pfeil (*XmnI*-Schnittstelle). Die 13 bp-Deletion des Plasmides pBT-157 wurde in das Plasmid pBT-153 eingefügt. Zur Orientierung sind die *BamHI*-Schnittstelle, welche die Grenze zwischen Haupt- und Nebenpromotor markiert, und der Transkriptionsstartpunkt (TSP) angezeigt. Im unteren Teil ist die mittlere autoregulatorische Repression der Promotorkonstrukte angegeben (Einzeldaten in Anhang II). Das Plasmid pBT-100 beinhaltet den vollständigen *EFG1*-Hauptpromotor. Die grau unterlegte Sequenz von der *BamHI*-Schnittstelle bis zum TSP ist nicht in den Konstrukten enthalten. Zusätzlich ist die TATA-Box hervorgehoben.

Die Deletionen pBT-150 (10,1 ± 6,2) und pBT-153 (8,1 ± 3,7) zeigten eine dem vollständigen *EFG1*-Promotor (pBT-100: 9,2 ± 1,7) vergleichbare autoregulatorische Repression (Abb. 25). Die Deletion pBT-156 führte jedoch zu einer deutlich reduzierten *Efg1p*-abhängigen Repression der Luziferase-Aktivität (3,3 ± 1,4), so daß in dem deletierten Bereich auf eine funktionelle Domäne der *EFG1*-Autoregulation rückgeschlossen werden kann. Eine Deletion, welche die TATA-Box einschließt (pBT-157), vermittelte ebenfalls noch Luziferase-Aktivität, allerdings keine autoregulatorische Repression (0,9 ± 0,2).

Zusammenfassend wurde die autoregulatorische Repression des *EFG1*-Hauptpromotors durch eine 45 bp große Promotorregion vermittelt. Nur die Deletion der TATA-Box-Region (13 bp-Deletion in Plasmid pBT-157) führte zu einem völligen Verlust der Autoregulation

3.7.3 Überproduktion von Efg1p-Varianten

Bei allen zuvor beschriebenen Experimenten erfolgte die Überproduktion der Wildtypform von Efg1p. Bockmühl (2001) stellte zahlreiche Efg1p-Varianten her und untersuchte die Aktivierung von Efg1p über Phosphorylierungen. Zwei dieser Varianten wurden im „Zwei-Plasmid-Modell“ auch im Hinblick auf ihre Fähigkeit, eine autoregulatorische Repression des *EFG1*-Hauptpromotors zu vermitteln, getestet. Die Austausch T206A, welcher eine nicht phosphorylierbare Aminosäure (Alanin) an einer potentiellen PKA-Zielsequenz einfügt, und T248E, welcher eine ständig phosphorylierte Aminosäure (Glutamat) an einem konservierten Threonin imitiert, wurden unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors überproduziert und die reprimierende Wirkung auf den *EFG1*-Hauptpromotor (pBT-34) über die *LAC4*-Expression bestimmt. Die Mutagenese von *EFG1* erfolgte auf dem *ADE2*-Plasmid pAPE(2)/ADE. Jeweils zwei unabhängige Klone (T206A: pBT-55A/B; T248E: pBT-140/-141) wurden zusammen mit dem Reporterplasmid pBT-34 in den Stamm CAI8 transformiert und im „Zwei-Plasmid-Modell“ auf ihre autoregulatorische Funktion getestet (Abb. 26).



Im Vergleich mit der Wildtypform von Efg1p (11,5 +/- 3,6) zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der autoregulatorischen Repression (Abb. 26). Der Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungszustand an den Aminosäurepositionen 206 und 248 beeinflusst, obgleich er in der Hypheninduktion essentiell ist (Bockmühl, 2001), nicht die Fähigkeit von Efg1p, die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors zu reprimieren.

3.7.4 Autoregulation in *cap1*- und *tup1*-Mutanten

Der Transkriptionsfaktor Yap1p aus *S. cerevisiae* gehört zur acht Mitglieder umfassenden *YAP*-Genfamilie und ist in die oxidative Stressantwort involviert (Schnell *et al.*, 1992). Diese bZIP-Proteine wurden über die Bindung der Erkennungssequenz des humanen Proteins AP-1 identifiziert und benannt (Harshman *et al.*, 1988). Von vier Mitgliedern der Yap-Familie, darunter Yap1p, ist bekannt, daß sie sehr effizient die Sequenz TACTAA binden (Fernandes *et al.*, 1997). Im *EFG1*-Hauptpromotor befinden sich an Position -137 bis -131 (ATACTAT, Gegenstrang) und -125 bis -119 (ATACTAC) relativ zum Transkriptionsstart leicht

modifizierte Bindemotive (Abb. 10). Eine potentielle Funktion des *C. albicans*-homologen Proteins Cap1 (Alarco und Raymond, 1999) in der Autoregulation von *EFG1* sollte daher untersucht werden, ebenso wie eine Beteiligung von Tup1p. Dieser generelle Repressor in *S. cerevisiae* fungiert in *C. albicans* als Repressor filamentösen Wachstums, da eine *tup1*-Mutante konstitutiv Pseudohyphen bildet (Braun und Johnson, 1997). Da Tup1p in *S. cerevisiae* seine Repressorfunktion über die Interaktion mit dem DNA-bindenden Protein Ssn6p ausübt (Keleher *et al.*, 1992), könnte aufgrund der großen Homologie ein ähnlicher Mechanismus der autoregulatorischen Repression von *EFG1* zugrundeliegen.

Daher erfolgte in den Deletionsstämmen DSY1346 (*cap1/cap1*: Micheli, 2000) und BCa2-9 (*tup1/tup1*: Braun und Johnson, 1997) eine Northern-Analyse der *EFG1*-Autoregulation. Die *PCK1p::EFG1*-Fusion wurde auf dem Plasmid pRC2312/PCK1p::HYD1 in beide Stämme transformiert und die *EFG1*-Transkripte bei Repression (S4D) und Induktion (SCAA) des *PCK1*-Promotors analysiert.

In beiden Mutanten konnte die Repression des *EFG1*-Locus nachvollzogen werden (Abb. 27).

Die Überexpression des kurzen *EFG1*-Transkriptes (Spur 2, 4) hatte eine deutliche Abnahme (*cap1*) bzw. ein völliges Verschwinden (*tup1*) des langen *EFG1*-Transkriptes zur Folge.

Dabei ist jedoch zu beachten, daß ohne *EFG1*-Überexpression im *cap1*-Stamm (Spur 1) das lange *EFG1*-Transkript, wie im Wildtyp (Abb. 18), deutlich stärker exprimiert wurde als das kurze Transkript, während im *tup1*-Stamm (Spur 3) eine nahezu gleichmäßige Verteilung beider Transkripte zu verzeichnen war. Hier wurde das kurze Transkript im Vergleich mit dem Langen ungewöhnlich stark exprimiert.

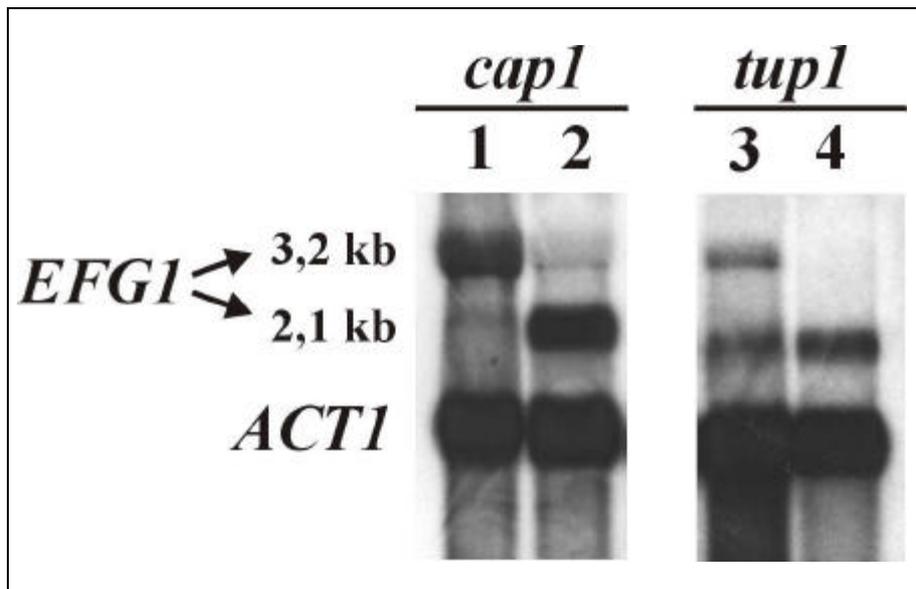


Abbildung 27: Northern-Analyse der *EFG1*-Autoregulation in *cap1/tup1*-Stämmen

In beide Stämme (DSY1346:*cap1*; BCa2-9: *tup1*) wurde zur *EFG1*-Überexpression das Plasmid pBI-HAHD1 transformiert. Beide *EFG1*-Transkripte wurden bei reprimierter Überexpression in S4D (1, 3) und induzierter Überexpression in SCAA (2, 4) analysiert.

3.7.5 Autoregulation in *sir2*-Mutante

Die Deletion von *SIR2* beschleunigt den Wechsel zwischen verschiedenen Phänotypen in *C. albicans* (Perez-Martin *et al.*, 1999). Da Sir2p (silent information regulator) in *S. cerevisiae* in mehrere „silencing“-Phänomene, wie z.B. die „stillen“ Paarungstyploci, involviert ist (Loo und Rine, 1994), wird für Sir2p in *C. albicans* eine ähnliche regulatorische Funktion in der Organisation der Chromatinstruktur diskutiert (Perez-Martin *et al.*, 1999). Inwiefern diese Mechanismen neben der Ausprägung verschiedener Phänotypen auch die Autoregulation des *EFG1*-Locus beeinflussen oder ihr zugrundeliegen, wurde in einer

sir2-Mutante überprüft. In den Stamm CMP7 (*sir2/sir2*) wurde eine Fusion des *PCK1*-Promotors an *EFG1* (pBI-HAHYD) transformiert und die genomische *EFG1*-Expression bei episomaler Überexpression von *EFG1* über den Transkriptspiegel analysiert (Abb. 28).

Eine mögliche Modifikation der Chromatinstruktur besteht in der Deacetylierung von Histonen, deren Bedeutung für *C. albicans* vor kurzem anhand des Einflusses des Deacetylaseinhibitors Trichostatin A auf den Phänotypwechsel beschrieben wurde (Klar *et al.*, 2001). Um eine Beteiligung der Deacetylierung auf die *EFG1*-Autoregulation zu evaluieren, wurde die genomische *EFG1*-Expression unter episomaler *EFG1*-Überexpression ebenfalls in Anwesenheit dieses Inhibitors untersucht (Abb. 28)

Die beiden Transformanten des *sir2*-Stammes (I./II.) zeigten nur z.T. das erwartete *EFG1*-Expressionsmuster (Abb.28).

Die erste Transformante zeigte ohne *EFG1*-Überexpression die normale Verteilung der genomischen *EFG1*-Transkripte (Spur 1). Die Induzierung des *PCK1*-Promotors bzw. die episomale *EFG1*-Überexpression führte jedoch nicht wie erwartet zu einer Repression des genomisch exprimierten

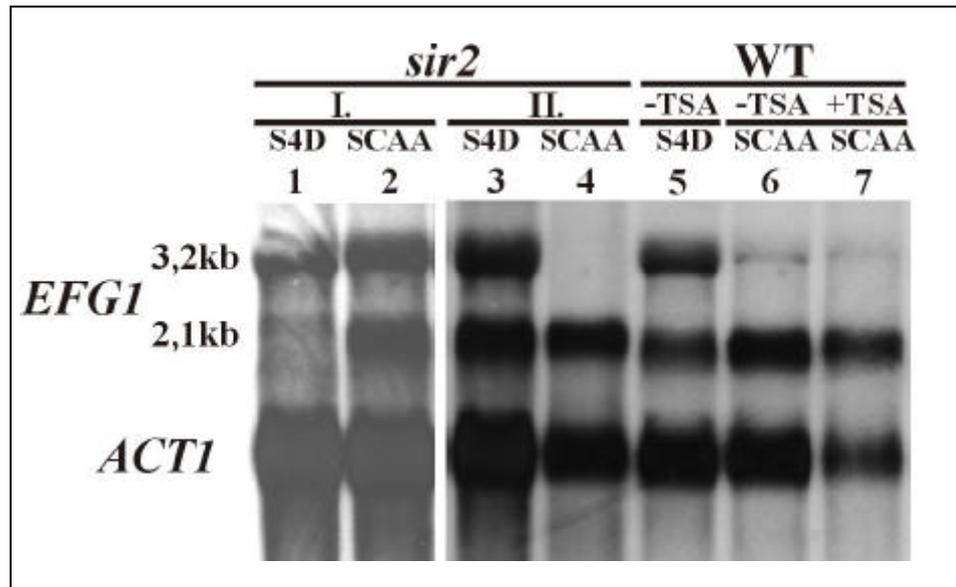


Abbildung 28: Northern-Analyse der *EFG1*-Autoregulation in einer *sir2*-Mutante. Zwei unabhängige Transformanten (I./II.) des Stammes CMP7 (*sir2/sir2*) mit dem Plasmid pBI-HAHYD (*PCK1p::EFG1*) wurden auf ihre *EFG1*-Expression sowohl in *PCK1p*-reprimierendem Medium (S4D) als auch in induzierendem Medium (SCAA) analysiert. Zusätzlich wurde im Wildtypstamm CAI8, transformiert mit dem *EFG1*-Überexpressionsplasmid pAPE(2)/ADE, die Autoregulation mit (Spur 7) und ohne Trichostatin A (Spur 6) untersucht. Der Inhibitor wurde in der Kultur in einer Konzentration von 50µg/ml eingesetzt. *ACT1*-mRNA dient als Mengenstandard.

langen *EFG1*-Transkriptes, sondern dessen Menge blieb konstant (Spur 2). Die zweite Transformante exprimiert jedoch unter Repression der episomalen *EFG1*-Expression vom genomischen Locus beide *EFG1*-Transkripte in gleicher Menge (Spur 3), wohingegen die induzierte episomale Überexpression von *EFG1* in erwarteter Form die Expression des langen Transkriptes reprimierte (Spur 4).

Im Wildtyp verursachte die Induktion der episomalen *EFG1*-Überexpression sowohl mit (Spur 7) als auch ohne Trichostatin A (Spur 6) eine deutliche Abschwächung des genomisch exprimierten langen *EFG1*-Transkriptes (Spur 5). Während die Deletion von *SIR2* somit nur in einer von zwei Transformanten die Expression und Autoregulation von *EFG1* beeinflusste, zeigte Trichostatin A als Deacetylase-Inhibitor, zumindest in der eingesetzten Konzentration [50µg/ml], keine Wirkung auf die Efg1p-vermittelte Repression des *EFG1*-Hauptpromotors. Eine Beteiligung von Sir2p an der Autoregulation kann aufgrund der widersprüchlichen *EFG1*-Expressionsmuster in den Transformanten des *sir2*-Stammes nicht eindeutig beurteilt werden.

3.8 Regulation der *EFG1*-Expression

Die Expression des Gens für den Transkriptionsfaktor Efg1p wird in erster Linie durch den Promotor des langen *EFG1*-Transkriptes reguliert. Neben seiner autoregulatorischen Repression stand seine Aktivierung bzw. Reprimierung im Verlaufe verschiedener morphologischer Entwicklungsprogramme im Mittelpunkt des Interesses. Sowohl während der Hypheninduktion als auch im „white/opaque“-Phänotypwechsel des Stammes WO-1 wurde die Promotoraktivität bzw. der *EFG1*-Transkriptspiegel analysiert. Zusätzlich zu diesen „natürlichen“ Differenzierungsprozessen wurde die *EFG1*-Expression bei einer „artificialen“ Überproduktion sowohl der beiden katalytischen Untereinheiten der ProteinkinaseA Tpk1p und Tpk2p als auch des *EFG1*-Homologen Efh1p betrachtet. Zur Bestimmung der *EFG1*-Promotoraktivität diente in allen Fällen das *LAC4*-Reportergensystem (pBT-34).

3.8.1 Hypheninduktion

Die Deletion von *EFG1* reduziert in drastischem Ausmaß die Kompetenz von *C. albicans* zur Ausbildung von Hyphen (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Als maßgeblicher Regulator des Dimorphismus wurde die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors bei der Induktion von Hyphen durch Serum analysiert. Im Verlaufe der Hyphenbildung wurde bereits eine Abnahme des großen *EFG1*-Transkriptes beschrieben (Stoldt *et al.*, 1997). Inwiefern diese Abnahme auf einer reduzierten Aktivität des *EFG1*-Promotors beruht, wurde unter Verwendung einer *LAC4*-Reportergenfusion überprüft. Nach der Transformation des Plasmides pBT-34, welches eine *EFG1p::LAC4*-Fusion beinhaltet, in den Stamm CAI4 erfolgte über die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität eine indirekte Bestimmung der *EFG1*-Promotoraktivität bei der Hypheninduktion in Serummedium (Abb. 29).

Nach ca. 80 min. war eine vollständige Hypheninduktion erfolgt. Die β -Galaktosidase-Aktivität zeigte jedoch im gesamten Induktionsprozeß einen konstanten Verlauf. Die unbekannte Halbwertszeit des Lac4-Proteins stellt allerdings bei Rückschlüssen auf die *EFG1*-Promotoraktivität einen Unsicherheitsfaktor dar. Ob der *EFG1*-Hauptpromotor während der Hypheninduktion eine konstante Aktivität zeigte, kann daher ohne eine Analyse des *LAC4*-Transkriptspiegels nicht zweifelsfrei beurteilt werden.

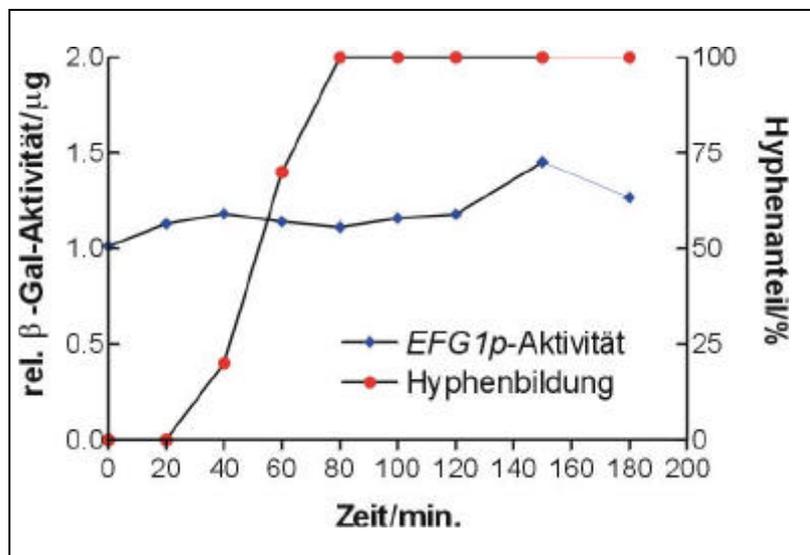


Abbildung 29: *EFG1p*-Aktivität während der Hypheninduktion
Über einen Zeitraum von drei Stunden erfolgte die Induktion von Hyphen in 10% Serum. Der Hyphenanteil wurde mikroskopisch ausgezählt. Die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors wurde durch eine *EFG1p::LAC4*-Fusion auf Plasmid pBT-34 in Stamm CAI4 über die luminometrische Messung der β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

3.8.2 *TPK1/TPK2*-Überexpression

Durch epistatische Untersuchungen und durch Mutagenese potentieller Phosphorylierungsstellen konnte Bockmühl (2001) zeigen, daß Efg1p unterhalb von PKA in einem cAMP-vermittelten Signalweg die Differenzierungsprozesse des Dimorphismus reguliert. Die *EFG1*-Expression ist insofern unabhängig von Tpk1p und Tpk2p, als daß in einer konditionalen *tpk1/tpk2*-Mutante eine dem Wildtyp vergleichbare *EFG1*-Expression beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Es sollte daher getestet werden, ob ein erhöhter *TPK1*- oder *TPK2*-Transkriptspiegel, wie er z.B. bei der Hypheninduktion auftritt, die *EFG1*-Expression verändert.

Unter einer *PCK1p*-vermittelten Überexpression erfolgte einerseits die Analyse der *EFG1*-Transkripte (Abb. 30), andererseits die Bestimmung der *EFG1p*-Aktivität mittels des Reportergens *LAC4* (Abb. 31).

Die Induktion des *PCK1*-Promotors in SCAA und damit die Überexpression von *TPK1* oder *TPK2* (Abb. 30, Spur 2 und 4) führten zu einer deutlichen Abnahme des *EFG1*-Haupttranskriptes im Vergleich zur Repression des *PCK1*-Promotors in S4D (Spur 1 und 3). Obwohl der *ACT1*-Standard unter induzierenden Bedingungen (Spur 2 und 4) eine geringfügig größere RNA-Menge anzeigte als unter reprimierenden Bedingungen (Spur 1 und 3), sank der *EFG1*-Transkriptspiegel. Das *EFG1*-Nebentranskript zeigte hingegen keine Veränderung durch *TPK1/TPK2*-Überexpression.

Da das Absinken des *EFG1*-Transkriptspiegels sowohl durch eine verringerte mRNA-Stabilität als auch durch eine reduzierte *EFG1*-Promotoraktivität verursacht werden kann, wurde mittels einer *LAC4*-Fusion daher die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors in Abhängigkeit der Überexpression von *TPK1* und *TPK2* untersucht. Dazu wurde neben den Überexpressionsplasmiden pBT-151 (*TPK1*) und pBT-152 (*TPK2*) in den *C. albicans*-Stamm CAI8 das Reporterplasmid pBT-34 transformiert. Jeweils vier unabhängige Transformanten wurden unter reprimierenden Bedingungen in S4D-Medium angezogen und anschließend sechs Stunden in SCAA-Medium die *TPK1/TPK2*-Überexpression induziert (analog zur Analyse der *EFG1*-Transkripte). Als Verhältnis der β -Galaktosidase-Aktivität unter Repression und Induktion der Überexpression von *TPK1* bzw. *TPK2* wurde die Repression der Aktivität des *EFG1*-Promotors bestimmt (Abb. 31).

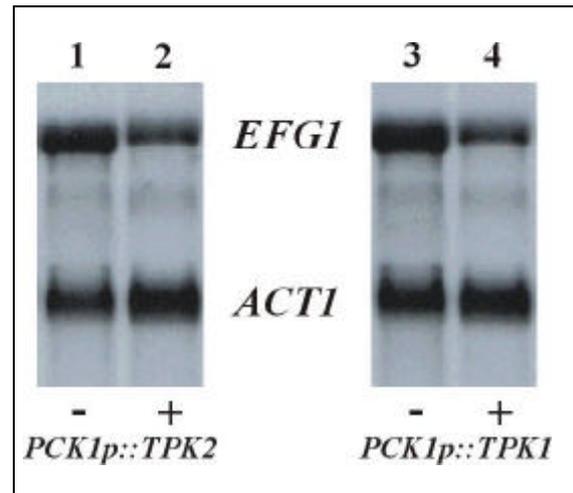
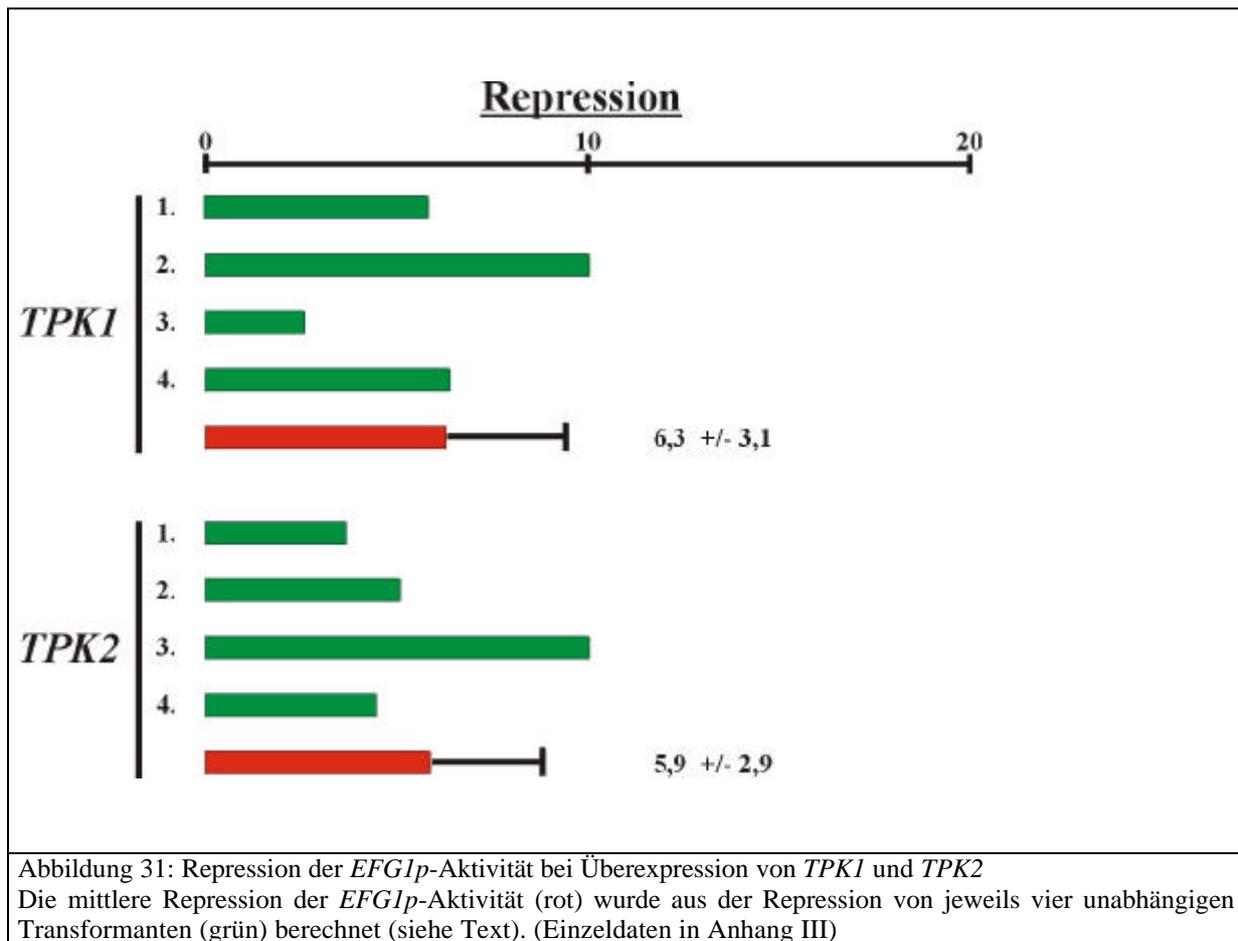


Abbildung 30: Northern-Analyse der *EFG1*-Transkripte bei *TPK1/TPK2*-Überexpression
Die Plasmide pBI-HisC.TPK1 und pBI/TPK2 mit einer *PCK1p*-Fusion wurden in den Stamm CAI4 transformiert und die *EFG1*-Transkripte in S4D (1, 3) und SCAA (2, 4) analysiert. *ACT1*-mRNA diente als Mengenstandard.

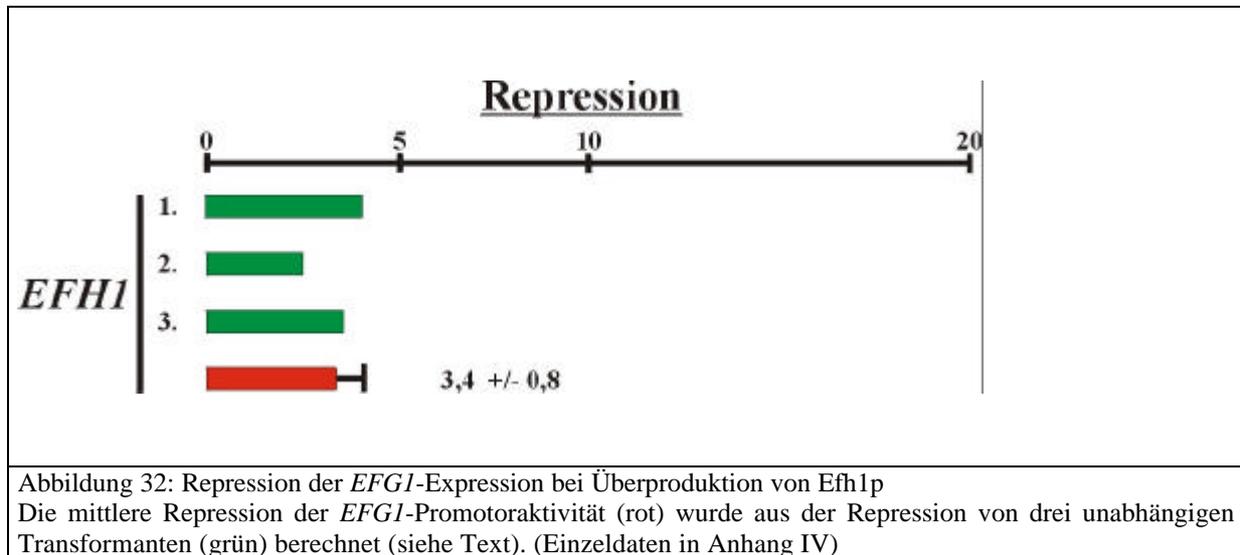


Zusammenfassend führte die episodale Überexpression von *TPK1* und *TPK2* zu einer ca. sechsfach reduzierten Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors (Abb. 31). Die Reduzierung des *EFG1*-Transkriptspiegels durch Überexpression von *TPK1* und *TPK2* resultierte somit nicht aus einer verminderten Transkriptstabilität, sondern aus einer Repression des *EFG1*-Hauptpromotors.

3.8.3 *EFH1*-Überexpression

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist mit zwei Mitgliedern, *PHD1* und *SOK2*, in der APSES-Genfamilie vertreten. Beide sind in antagonistischer Form in die Pseudohyphenbildung involviert. Sowohl die Überexpression von *PHD1* als auch die Deletion von *SOK2* haben ein verstärktes filamentöses Wachstum zur Folge (Ward *et al.*, 1995; Gimeno und Fink, 1994). Vor kurzem gelang auch in *C. albicans* die Identifizierung eines zweiten APSES-Gens neben *EFG1*, dessen Genprodukt auf Proteinebene im Bereich der APSES-Domäne eine große Homologie zu den übrigen Mitgliedern dieser Genfamilie zeigt und mit *EFH1* bezeichnet wurde (Bockmühl, 2001). Es ist wie *EFG1* an der Regulation filamentösen Wachstums in *C. albicans* beteiligt, da seine Überexpression pseudohyphales Wachstum verursacht (Bockmühl, 2001). Die Überexpression von *EFG1*, welche ebenso einen Pseudohyphen-Phänotyp zeigt, führt zur Repression der *EFG1*-Promotoren („negative Autoregulation“; siehe 3.7). Daher wurde die Wirkung einer *EFH1*-Überexpression auf die *EFG1p*-Aktivität analysiert.

Mittels des „Zwei-Plasmid-Systems“ (Abb. 19) wurde anhand der *LAC4*-Expression der Effekt einer *PCK1p*-vermittelten Überexpression von *EFH1* (pBT-145) auf die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors in Plasmid pBT-34 beurteilt. Die β -Galaktosidase-Aktivität von drei verschiedenen Transformanten mit Reporter- und Überexpressionsplasmid wurde sowohl unter Repressions- (S4D) als auch Induktionsbedingungen (SCAA) der *PCK1p::EFH1*-Expressions-kassette bestimmt (Abb. 32).

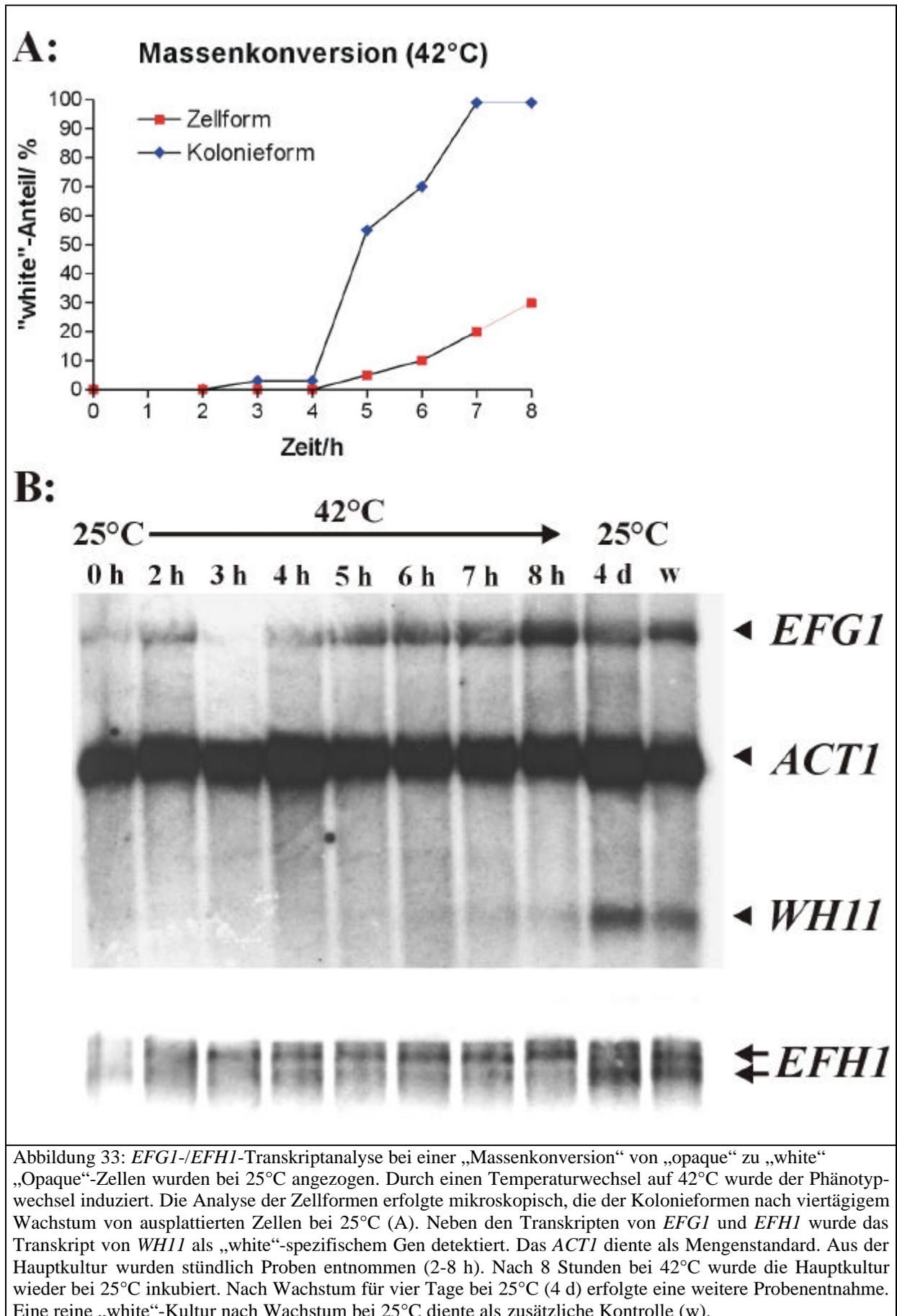


Die Überproduktion des Efg1p-Homologen Efh1p führte, wie die Überproduktion von Efg1p, zu einer Repression der *EFG1*-Promotoraktivität (Abb. 32). Diese Efh1p-abhängige Repression ($3,4 \pm 0,8$) betrug ca. ein Drittel der negativen Autoregulation von *EFG1* (Abb. 21: $11,5 \pm 3,6$).

3.8.4 „White/opaque“-Phänotypwechsel

Der „white/opaque“-Phänotypwechsel des Stammes WO-1 stellt neben dem Dimorphismus von *C. albicans* eine weitere Form des reversiblen Wechsels zwischen zwei verschiedenen Wachstumsformen dar. Während der „white“-Phänotyp sich durch eine rundlich bis ovale Zellform und eine „normale“ leicht erhobene weiße Kolonieform auszeichnet, weist die „opaque“-Form elongierte stäbchenförmige Zellen und relativ glatte gräuliche Kolonien auf (Soll *et al.*, 1993). „Opaque“-Zellen können lediglich bei 25°C relativ stabil, ohne einen Phänotypwechsel, kultiviert werden, „white“-Zellen sind hingegen auch bei 30°C stabil.

Da die Überexpression von *EFG1* im „opaque“-Phänotyp den Wechsel zur „white“-Form in erheblichen Ausmaß forciert (Sonneborn *et al.*, 1999b), scheint dieser Transkriptionsfaktor im Phänotypwechsel eine regulatorische Schlüsselfunktion zu besitzen. Zur näheren Untersuchung seiner Funktion erfolgte eine Northern-Analyse des *EFG1*-Haupttranskriptes im Verlaufe einer bei 42°C induzierten „Massenkonversion“ vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp (Abb. 33). Zuvor war nur im „white“-Phänotyp das *EFG1*-Haupttranskript nachgewiesen worden, während der „opaque“-Phänotyp keine *EFG1*-Expression zeigte (Sonneborn, 1999).



Der Verlauf der Massenkonzersion wurde einerseits über die mikroskopische Kontrolle der Zellform in der Hauptkultur verfolgt (Abb. 33, A). Andererseits wurde zur Analyse der Kolonieförmigkeit zu den angegebenen Zeitpunkten (0-8 h) der Hauptkultur eine Probe entnommen und in geeigneter Verdünnung (ca. 50-100 Zellen/Platte) ausplattiert und vier Tage bei 25°C kultiviert. Zur Unterscheidung zwischen „opaque“- und „white“-Kolonien wurde den Platten der Farbstoff Phloxin B (5 µg/ml) beigemischt, welcher „opaque“-Kolonien eine rötliche Färbung verleiht. Zusätzlich zu dieser optischen Unterscheidung erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellform in den Kolonien.

Nach drei Stunden bei 42°C waren ca. 3 % der „opaque“-Zellen auf einen Wechsel des Phänotyps festgelegt, während in der Hauptkultur mikroskopisch noch keine „white“-Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 33, A). Nach fünf Stunden entwickelten 55 % der Zellen eine „white“-Kolonieförmigkeit, obwohl nur 5 % der Zellen eine „white“-Zellform aufwiesen. Nach sieben Stunden ist der Anteil der „white“-Zellen in der Hauptkultur auf 30 % angestiegen, der induzierte Wechsel zum „white“-Phänotyp ist hingegen schon insoweit abgeschlossen, als daß 100% der Zellen „white“-Kolonien bildeten, wenn sie ausplattiert und bei 25°C kultiviert wurden.

Die Analyse des *EFG1*-Haupttranskripts zeigte im Verlauf der Massenkonzersion (Abb. 33, B) zu Beginn (0 h) im „opaque“-Phänotyp ein kaum detektierbares Signal. Es könnte auf einen minimalen Anteil von „white“-Zellen in der „opaque“-Kultur zurückgehen, wenngleich auch die Analyse der Kolonieförmigkeit zu diesem Zeitpunkt keine „white“-Kolonien nachwies. Dies kann allerdings mit der relativ niedrigen Koloniezahl (50-100) auf den Platten erklärt werden. Im „opaque“-Phänotyp bei 25°C sollte keine Expression des *EFG1*-Haupttranskripts stattfinden (Sonneborn, 1999). Zwei Stunden nach dem Wechsel auf 42°C erfolgte jedoch bereits eine Transkription von *EFG1*, obwohl noch keine „white“-Zellen in der Hauptkultur nachweisbar waren. Im weiteren Verlauf (3-8 h) nahm die Menge des *EFG1*-Transkripts stetig zu (das schwächere Signal nach 3 und 4 Stunden beruht vermutlich auf einem mangelnden Transfer der RNA in diesem Bereich). Eine Expression des „white“-spezifischen Gen *WH11* erfolgte im Gegensatz zu *EFG1* nur nach vier Tagen Wachstum der Hauptkultur bei 25°C (4 d) bzw. in der „white“-Kontrolle (w). Zusammenfassend nahm in der Phase, in der der Wechsel des Phänotyps von „opaque“ zu „white“ determiniert wird (2-7 h), die *EFG1*-Expression stetig zu, während keine Expression des „white“-spezifischen Gen *WH11* in diesem Zeitraum nachweisbar war. Somit reflektierte der *EFG1*-Transkriptspiegel die Kompetenz der Zellen zum Phänotypwechsel, nicht nur den Endzustand.

3.9 *EFH1*-Expression im Phänotypwechsel

Aufgrund seiner Homologie zu *Efg1p* sollte eine potentielle Funktion von *Efh1p* im Phänotypwechsel untersucht werden. Daher wurde der *EFH1*-Transkriptspiegel im Verlauf der Massenkonzersion vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp analysiert (Abb. 33, B). Während zu Beginn in der reinen „opaque“-Kultur (0 h) keine *EFH1*-Transkription erfolgte, wurden in einer reinen „white“-Kultur (nach vier Tagen Wachstum der Hauptkultur bei 25 °C (4 d) bzw. in der „white“-Kontrolle (w)) zwei *EFH1*-Transkripte nachgewiesen. Ein 2,5 kb- und ein 2,7 kb-Transkript wurden in nahezu vergleichbarer Menge exprimiert. „White“-Zellen, welche den induzierten Wechsel von der „opaque“-Form vollzogen haben, zeigten nach vier Tagen Wachstum bei 25°C (4 d) jedoch eine leicht verstärkte Expression des kleinen Transkripts. Die Expression von *EFH1* wurde parallel zur *EFG1*-Expression induziert. Nach drei Stunden (3 h) konnte das größere *EFH1*-Transkript detektiert werden. Die Induktion der *EFH1*-Expression war gegenüber der *EFG1*-Induktion (2 h) leicht verzögert. Die Menge des großen *EFH1*-Transkripts nahm bis zum Ende der Massenkonzersion (8 h) kaum zu.

Zusammenfassend wurde die Expression des großen *EFH1*-Transkriptes (2,7 kb) im Vergleich mit *EFG1* während der Massenkonzersion leicht verzögert induziert, während das kleine *EFH1*-Transkript (2,5 kb) parallel zum *WHI1*-Transkript im „white“-Phänotyp gebildet wurde. Das Expressionsmuster der *EFH1*-Transkripte deutete auf eine Funktion von Efh1p in der Regulation des Phasenwechsels von „opaque“ zu „white“.

Durch die Überexpression von *EFG1* im „opaque“-Phänotyp konnte ebenso wie durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C eine Massenkonzersion zum „white“-Phänotyp ausgelöst werden (Sonneborn *et al.*, 1999b). Ob Efh1p auch in dieser Hinsicht eine ähnliche Funktion wie Efg1p besitzt, sollte in einem ähnlichen Überexpressionsexperiment analysiert werden.

Dazu wurde in die „opaque“-Form des Stammes Red3/6, ein *ade2*-Derivat von WO-1, das Plasmid pBT-145 (*PCK1p::EFH1*) und als Kontrolle das Plasmid pBT-44 (*PCK1p*) transformiert. Vier unabhängige Transformanten (pBT-145) und ein Kontrollstamm (pBT-44) wurden zwei Tage bei 25°C sowohl in S4D-Medium, zur Repression des *PCK1*-Promotors, als auch in SCAA-Medium, zur Induktion der *EFH1*-Überexpression, angezogen. In geeigneter Verdünnung (50-200 Kolonien/Platte) wurden anschließend die S4D-Kulturen auf S4D-Platten und die SCAA-Kulturen auf SCAA-Platten ausplattiert und bei 25°C inkubiert. Zur leichteren visuellen Unterscheidung von „opaque“- und „white“-Kolonien enthielten die Platten den Farbstoff Phloxin B (5 µg/ml) zur selektiven Rotfärbung von „opaque“-Kolonien. Die Phänotypen der Kolonien wurden zusätzlich durch mikroskopische Kontrolle der Zellform bestimmt.

Der Kontrollstamm (pBT-44: *PCK1p*) entwickelte unter reprimierenden (Abb. 34: C) sowie induzierenden Bedingungen (D) reine „opaque“-Kolonien. Dagegen bildeten Stämme mit der *PCK1p::EFH1*-Fusion auf reprimierenden Medium ebenfalls reine „opaque“-Kolonien (A); bei Induktion der *EFH1*-Überexpression zeigten die Kolonien jedoch weiße Sektoren (B).

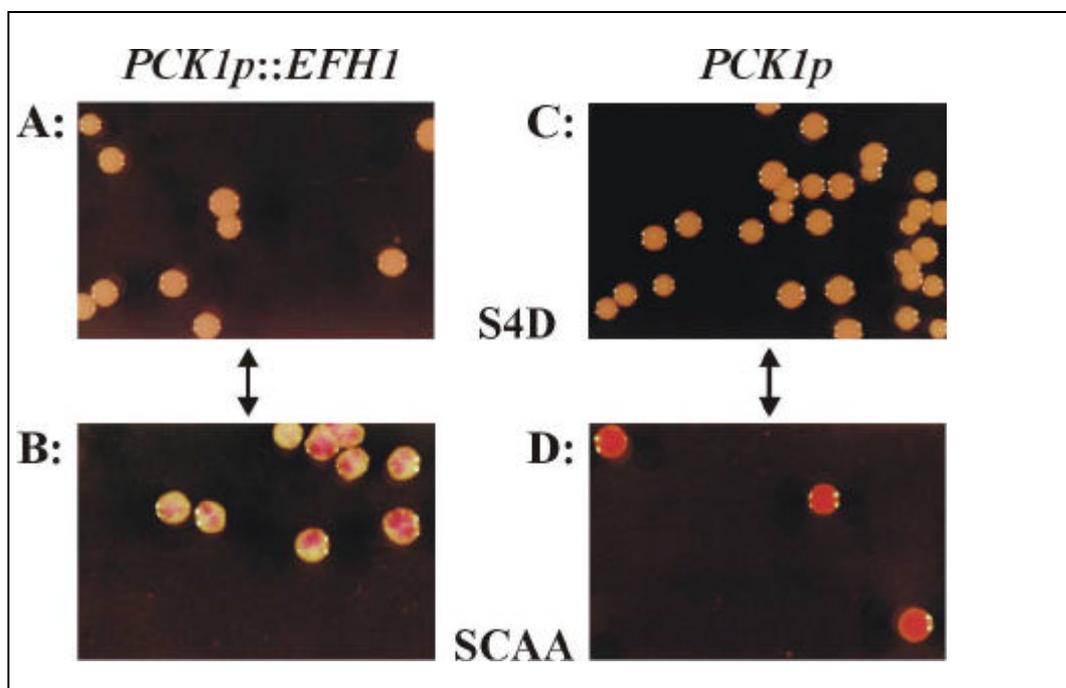


Abbildung 34: Überexpression von *EFH1* im „opaque“-Phänotyp des Stammes Red3/6
Die Transformanten mit dem Überexpressionsplasmid pBT-145 (*PCK1p::EFH1*) (A, B) und der Kontrollstamm mit dem Plasmid pBT-44 (*PCK1p*) (C, D) wurden auf S4D (A, C) und SCAA (B, D) ausplattiert. Nach Inkubation bei 25°C für eine Woche erfolgte die Analyse des Phänotyps der Kolonien. „Opaque“-Zellen wurden mit dem Farbstoff Phloxin B selektiv angefärbt. Aufgrund der höheren Koloniedichte auf den S4D-Platten fällt die Rotfärbung der „opaque“-Kolonien dort insgesamt etwas schwächer aus.

Die Zellen dieser Sektoren konnten nach mikroskopischer Kontrolle der Zellform dem „white“-Phänotyp zugeordnet werden. Die episomale *EFHI*-Überexpression forcierte somit den Wechsel vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp.

Eine quantitative Analyse dieses Effektes erfolgte durch Auszählen der homogenen „opaque“-Kolonien und der inhomogenen Kolonien mit „white“-Sektoren. Auf reprimierendem Medium (S4D) erfolgte kein Wechsel des Phänotyps (Tab. 2). Die Kontrolle (pBT-44: *PCK1p*) behielt auch auf induzierendem Medium die „opaque“-Form bei. Der Anteil reiner „opaque“-Kolonien ging bei Überexpression von *EFHI* auf bis zu 2 % zurück. Kolonien mit den oben gezeigten „white“-Sektoren (Abb. 34) nahmen einen Anteil zwischen 40-98 % ein.

	SCAA	S4D
pBT-44 (<i>PCK1p</i>)	100 %	100 %
1. pBT-145 (<i>PCK1p::EFHI</i>)	10 %	100 %
2. pBT-145 (<i>PCK1p::EFHI</i>)	60 %	100 %
3. pBT-145 (<i>PCK1p::EFHI</i>)	10 %	100 %
4. pBT-145 (<i>PCK1p::EFHI</i>)	2 %	100 %

Tabelle 2: Quantitative Analyse der *EFHI*-Überexpression in Stamm Red3/6

Vier unabhängige Transformanten mit dem Plamid pBT-145, welches die Überexpressionskassette beinhaltet, wurden auf induzierendem Medium (SCAA) und reprimierendem Medium (S4D) ausplattiert und der Anteil reiner „opaque“-Kolonien bestimmt.

Zusammenfassend erhöhte die episomale Überexpression von *EFHI* in allen untersuchten Transformanten die Rate des Wechsels vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp. In seiner Fähigkeit, diesen Wechsel zu forcieren, zeigte *Efh1p* eine ähnliche Kompetenz wie *Efg1p*.

3.10 Regulation der *TPK1/TPK2*-Expression

Die Funktion des Transkriptionsfaktors *Efg1p* in der Hyphenbildung von *C. albicans* wird in einem cAMP-abhängigen Signalweg über die Proteinkinase A vermittelt (Bockmühl, 2001). Die beiden katalytischen Untereinheiten von PKA, *Tpk1p* und *Tpk2p*, besitzen dabei unterschiedliche und z.T. redundante Funktionen. Als ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Isoformen wurde festgestellt, daß die PKA-vermittelte Hyphenbildung auf festen Medien hauptsächlich über *Tpk1p*, in flüssigen Medien über *Tpk2p* reguliert wird (Bockmühl, 2001). Eine direkte Phosphorylierung von *Efg1p* durch *Tpk1p* oder *Tpk2p* konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Die funktionellen Zusammenhänge zwischen PKA und *Efg1p* wurden einerseits über epistatische Untersuchungen, andererseits über die Mutation potentieller Zielsequenzen in *Efg1p* aufgeklärt (Bockmühl und Ernst, 2001). In dieser Arbeit wurde die Repression des *EFG1*-Hauptpromotors durch Überproduktion von *Tpk1p* und *Tpk2p* gezeigt (siehe 3.8.2). Über die Northern-Analyse der *TPK*-Transkripte in einer *efg1*-Mutante sollte daher untersucht werden, ob auch *Efg1p* die Expression von *TPK1* oder *TPK2* beeinflusst.

Im Rahmen dieser Analyse wurde auch die *TPK*-Expression der konditionalen *tpk1/tpk2*-Mutante M231 überprüft. In dieser Mutante wurden beide *TPK2*-Allele und ein *TPK1*-Allel disruptiert. Das andere *TPK1*-Allel wurde unter die Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors gestellt. Unter reprimierenden Bedingungen sollte nur ein minimaler *TKP1*-Transkriptspiegel nachweisbar sein. Zusätzlich wurde der *TPK*-Transkriptspiegel bei *PCK1p*-vermittelter Überexpression von *TPK1* und *TPK2* analysiert.

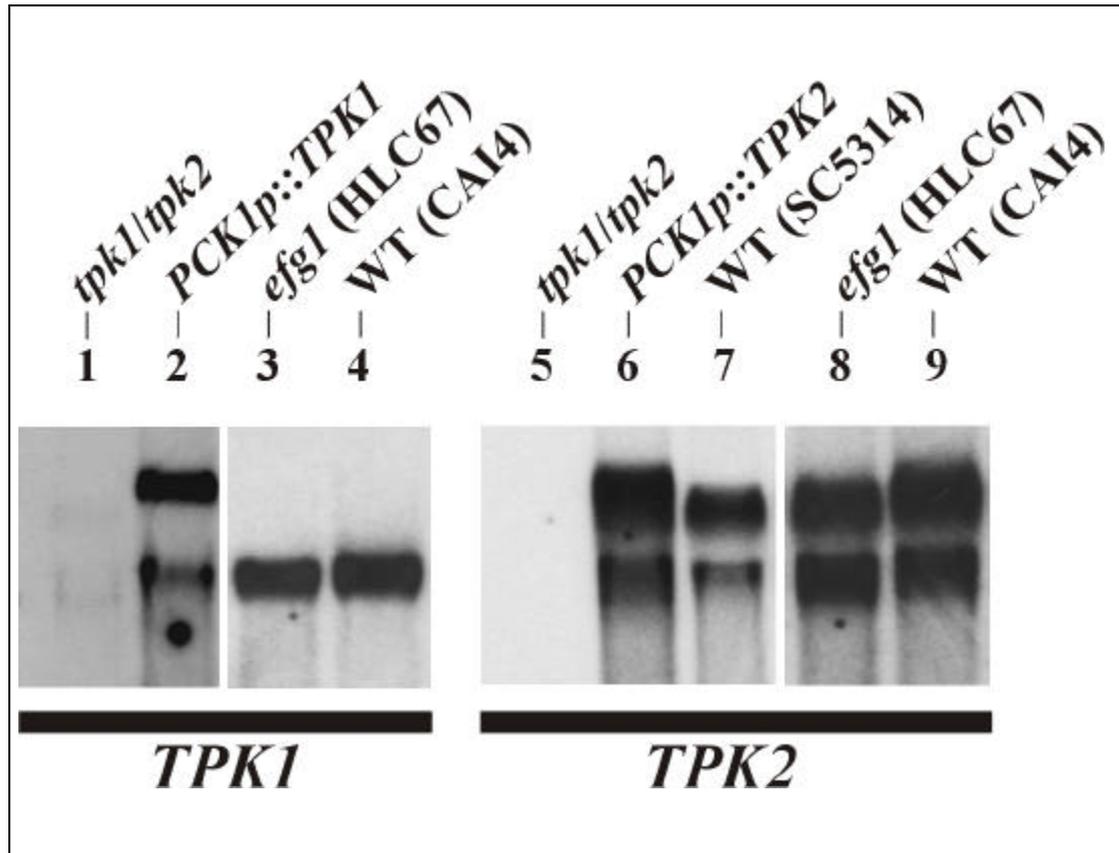


Abbildung 35: Northern-Analyse der *TPK1*- und *TPK2*-Expression

Die konditionale Mutante M231 wurde unter reprimierenden Bedingungen in S4D-Medium angezogen und ist mit *tpk1/tpk2* gekennzeichnet (Spur 1, 5). Die Überexpression von *TPK1* (Spur 2) und *TPK2* (Spur 6) erfolgte im Stamm CAI4 nach Transformation mit den Plasmiden pHIStag/C.TPK1 (*PCK1p::TPK1*) und pHIStag/C.TPK2 (*PCK1p::TPK2*) in induzierendem SCAA-Medium. Der Wildtypstamm (WT) CAI4 (Spur 4, 9) und der *efg1*-Deletionstamm (*efg1*) HLC67 (Spur 3, 8) wurden in YPD-Medium angezogen. Zusätzlich wurden die *TPK2*-Transkripte des Wildtypstammes SC5314 nach Wachstum in S4D-Medium analysiert (Spur 7). Die ribosomale RNA diente als Mengenstandard und zur Größenbestimmung der *TPK*-Transkripte (Daten nicht gezeigt).

Während der *TPK1*-Locus nur in ein *TPK1*-Transkript mit einer ungefähren Größe von 1,6 kb transkribiert wurde (Abb. 35: Spur 3 und 4), erfolgte die genomische *TPK2*-Expression in zwei Transkripte. Neben einem kleinen Transkript von ebenfalls 1,6 kb wurde ein großes *TPK2*-Transkript von etwa 2,5 kb detektiert (Spur 7, 8 und 9). Die konditionale *TPK*-Mutante M231 zeigte wie erwartet keine *TPK2*-Expression (Spur 5) und ein kaum zu detektierendes *TPK1*-Transkript (Spur 1). Bei *TPK1*-Überexpression wurde ein deutlich stärkeres Signal bei ca. 2,6 kb nachgewiesen (Spur 2). Bei Überexpression von *TPK2* wurde neben den beiden genomisch exprimierten *TPK2*-Transkripten (vgl. Spur 7) auch ein verstärktes Signal bei 2,6 kb detektiert, welches sich mit dem großen *TPK2*-Transkript überlagert (Spur 6).

Zwischen dem Wildtyp (CAI4) und der *efg1*-Deletion (HLC67) konnte kein Unterschied in der Expression beider *TPK*-Isoformen nachgewiesen werden. Weder der Spiegel des *TPK1*-Transkriptes (Spur 3 und 4) noch der der beiden *TPK2*-Transkripte (Spur 8 und 9) wies eine signifikante Veränderung in beiden Stämmen auf. Auch das Verhältnis zwischen kleinem und großem *TPK2*-Transkript blieb konstant. Die Deletion von *EFG1* beeinflusste weder die Expression von *TPK1* noch von *TPK2*.

4 Diskussion

C. albicans gilt als der bedeutendste Erreger von Pilzkrankungen des Menschen. Seine stetig wachsende Bedeutung verdankt er der zunehmenden Zahl prädisponierter Personen. Eine Immunsuppression des Wirtes ermöglicht es dem harmlosen Kommensalen, seine pathogenen Eigenschaften zu entwickeln. Das pathogene Potential von *C. albicans* basiert in Anpassung an seine verschiedenen Habitate auf einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Virulenzfaktoren. Neben der Adhäsion an Epi- und Endothelien des Wirtes über spezielle Oberflächenproteine (Adhäsine), der Sekretion proteo- und lipolytischer Enzyme und verschiedenen Phänotypwechseln wird dem Dimorphismus von *C. albicans* eine zentrale Bedeutung beigemessen. Der reversible Wechsel zwischen einzelligem Hefewachstum und der Ausbildung von Filamenten wird insofern als Virulenzfaktor angesehen, als daß die Hefeform der schnellen Vermehrung und der Verbreitung über den Blutkreislauf dient, während Hyphen ein größeres Adhäsionsvermögen zeigen und die Invasion in Wirtsgewebe vermitteln (Calderone und Braun, 1991). Klinische Isolate weisen stets beide Wachstumsformen auf, wobei die Filamente von *C. albicans* aufgrund ihrer Genese in echte Hyphen und Pseudohyphen unterteilt werden. Chlamydosporen gelten hingegen als Überdauerungsstadium (Odds, 1988).

Als essentieller Regulator der Morphogenese von *C. albicans* ist das APSES-Protein Efg1p an der Steuerung dieser Entwicklungsprozesse auf molekularer Ebene beteiligt. Seine Überexpression führt zur Ausbildung von Pseudohyphen, seine Deletion zu einem nahezu vollständigen Verlust der Hyphen- wie der Chlamydosporenbildung (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999a). In einem cAMP-abhängigen Signalweg reguliert der Transkriptionsfaktor Efg1p unterhalb der Proteinkinase A die Expression bisher noch nicht bekannter Zielgene (Ernst, 2000a, b). Die Regulation seiner eigenen Expression stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die Bestimmung des Transkriptionsstartes des langen *EFG1*-Transkriptes führte zur Identifizierung des *EFG1*-Hauptpromotors. Nach der Sequenzierung folgte über die Fusion mit verschiedenen Reportergenen die Analyse seiner Regulation in verschiedenen von Efg1p gesteuerten Prozessen. Die reprimierende Funktion von Efg1p wurde am Phänomen der negativen Autoregulation von *EFG1* untersucht. Über eine Deletionsanalyse gelang die Identifizierung der diesen Prozeß vermittelnden funktionellen Domäne im *EFG1*-Promotor. Eine Beteiligung von Efg1p an der Regulation des „white/opaque“-Phänotypwechsels konnte durch die Analyse des *EFG1*-Transkriptspiegels bestätigt werden. Die Überexpression von *EFH1* deutet auf eine ähnliche Funktion des zweiten APSES-Proteins in diesem Prozeß. Ferner lieferten Untersuchungen des *TPK1/TPK2*-Transkriptspiegel sowie Überexpressionsexperimente von *TPK1* und *TPK2* weitere Hinweise auf den postulierten funktionellen Zusammenhang von PKA und Efg1p in einem gemeinsamen cAMP-abhängigen Signalweg.

4.1 Bestimmung der *EFG1*-Transkriptionsstartpunkte

Aufgrund der Diskrepanz zwischen der Größe des offenen Leserahmens von *EFG1* (1,6 kb) und der Größe des *EFG1*-Transkriptes (3,2 kb) erfolgte am Beginn dieser Arbeit die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von *EFG1*.

Basierend auf der Bestimmung eines *EFG1*-Transkriptionstartpunktes von Stoldt (1995) an Position -35 verwendete Weide (1998) ein 1200 bp großes 5'-flankierendes Fragment des offenen Leserahmens von *EFG1* zur Charakterisierung des *EFG1*-Promotors. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, handelt es sich dabei jedoch um den Promotor eines kurzen, bis dahin nicht detektierten *EFG1*-Transkriptes.

4.1.1 Der *EFG1*-Locus generiert ein 3,2 kb Haupttranskript und ein 2,1 kb Nebentranskript

Die Northern-Analyse der *EFG1*-Expression im Wildtypstamm SC5314 zeigte die Transkription des *EFG1*-Locus in zwei Transkripte. Neben dem beschriebenen Haupttranskript von *EFG1* mit einer Größe von ca. 3,2 kb (Stoldt, 1995; Sonneborn, 1999) gelang die Detektion eines deutlich schwächer exprimierten kurzen *EFG1*-Transkriptes von ca. 2,1 kb (Abb. 5). Das Mengenverhältnis zwischen langem und kurzem Transkript konnte anhand der Signalstärke auf 20-30 zu 1 geschätzt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die *EFG1*-Transkripte in einem anderen *C. albicans*-Stamm beschrieben (Srikantha *et al.*, 2000). Der Stamm WO-1 mit seinen beiden Phänotypen „white“ und „opaque“ wies eine phasenspezifisch getrennte Expression der beiden *EFG1*-Transkripte auf, während im Stamm SC5314 beide Transkripte zusammen auftraten. Die „white“-Form zeigte, wie bereits von Sonneborn (1999) beschrieben, nur ein langes Transkript (3,2 kb), während in der „opaque“-Form nur ein kurzes *EFG1*-Transkript (2,2 kb) nachgewiesen wurde. Das Verhältnis zwischen beiden Transkripten wurde hier mit 20 zu 1 angegeben. Der Startpunkt des kurzen Transkriptes liegt an Position -165 (Srikantha *et al.*, 2000). Aufgrund des relativ großen Unterschiedes zu dem von Stoldt (1995) bestimmten Startpunkt an Position -35 wurde mittels 5'RACE erneut der Start des kurzen *EFG1*-Transkriptes bestimmt (siehe 3.2.3). Der ermittelte Start an Position -73 liegt 47 bp stromabwärts einer TATA-Box (Abb. 8). Zusammen mit dem offenen Leserahmen von *EFG1* (1656 bp) und der 3'UTR (412 bp, M. Gerards, pers. Mitteilung) ergibt sich für das kurze *EFG1*-Transkript eine Größe von 2141 bp. Die Differenz zum Transkript der „opaque“-Form (2,2 kb) kann auf dem unterschiedlichen Stammhintergrund beruhen.

Der Startpunkt des langen *EFG1*-Transkriptes wurde mittels 5'RACE an Position -1169 bestimmt und weicht nur eine Base von dem von Srikantha *et al.* (2000) in der „white“-Form des Stammes WO-1 beschriebenen ab. Dieser Startpunkt liegt aber aufgrund von Sequenzunterschieden an Position -1173. Die Unterschiede in der Sequenz des *EFG1*-Locus zeigen sich darüber hinaus auch in der Größe der 3'UTR (WO-1: 407 bp). Sogar der ORF von *EFG1* ist mit 1662 bp (554 AS) sechs Basen größer als der zuvor beschriebene mit 1656 bp (552 AS; Stoldt *et al.*, 1997).

Das lange *EFG1*-Transkript umfaßt in der Summe von 5'UTR (1169 bp), ORF (1656 bp) und 3'UTR (412 bp) insgesamt 3237 bp und bestätigt die Northern-Analysen (Abb. 36).

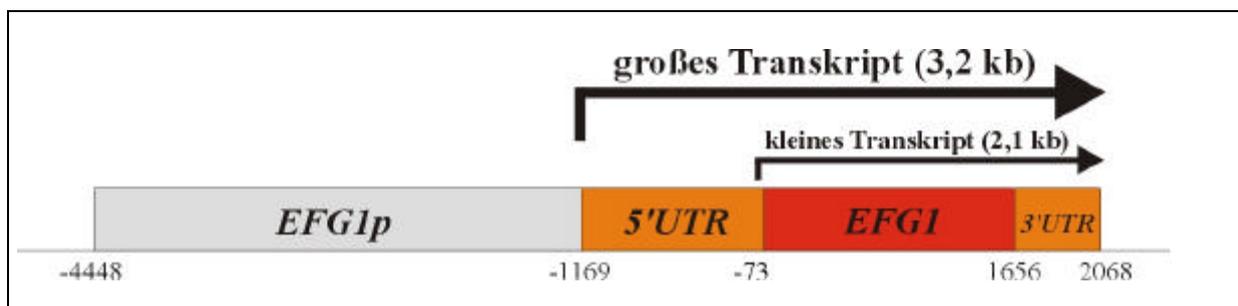


Abb. 36: Transkription des *EFG1*-Locus

Der Startpunkt des kurzen Transkriptes liegt an Position -73, der des langen Transkriptes an Position -1169. Beide Transkripte beinhalten eine 3'UTR von 412 bp. Da Weide für die Untersuchungen des Promotors des kurzen Transkriptes ein Fragment von -1200 (*Bam*HI) bis -1 verwendete, wurde zur Analyse des Promotors des langen Transkriptes (*EFG1p*) der 5'-flankierende Bereich bis -4448 (*Bgl*III) eingesetzt. Die Region der 5'UTR des langen Transkriptes stellt somit gleichzeitig nahezu den gesamten Promotor des kurzen *EFG1*-Transkriptes dar.

4.1.2 Das lange *EFG1*-Transkript enthält eine 1,2 kb große 5'UTR

Durch die Bestimmung des Startpunktes des langen *EFG1*-Transkriptes an Position -1169 gelang die Aufklärung der Größendifferenz zwischen dem Haupttranskript (3,2 kb) und dem ORF von *EFG1* (1,6 kb). Die beiden Transkripte von *StuA*, welches ein APSES-Protein in *Aspergillus nidulans* codiert (Miller *et al.*, 1992), enthalten vergleichbar ausgedehnte 5'-untranslatierte Regionen (*stuA* α : 1088 bp; *stuA* β : 1221 bp). Im Vergleich mit *S. cerevisiae* besitzt das Transkript des G₁-Cyclins *CLN3* mit 864 bp die größte 5'UTR (Polymenis und Schmidt, 1997). Eine ebenfalls ausgedehnte 5'UTR enthalten die Transkripte des Transkriptionsfaktors *GCN4* mit 591 bp und der Proteinkinase *Sch9* mit ca. 600 bp (Müller und Hinnebusch, 1986; Blasi *et al.*, 1993). Die 5'-untranslatierten Regionen der Transkripte der beiden in die Stressantwort involvierten Transkriptionsfaktoren *YAP1* und *YAP2* umfassen lediglich 164 bp bzw. 157 bp (Moye-Rowley *et al.*, 1989; Bossier *et al.*, 1993). Sie enthalten jedoch ebenso wie die zuvor aufgeführten Transkripte kleine offene Leserahmen, die als uORF („upstream open reading frame“) bezeichnet werden. Die 5'UTR von *YAP1* enthält einen uORF von 7 Codons, *YAP2* dagegen zwei uORFs mit 6 bzw. 23 Codons. Die Größe dieser uORFs reicht von vier Codons (*CLN3*) bis zu 55 Codons (*SCH9*). Die Funktion dieser uORFs in der posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression wurde am Regulator der Aminosäuresynthese von *S. cerevisiae* *GCN4* detailliert untersucht. Die regulatorische Funktion seiner vier uORFs mit einer Größe von 3 bis 4 Codons wird im Zusammenhang mit der Funktion der 5'UTR von *EFG1* in Abschnitt 4.3.1 diskutiert. Die 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes beinhaltet distal an Position -1074 bis -1060 ebenfalls einen uORF, der mit 6 Codons eine typische Größe besitzt (5'-ATG AAA ATA GAA TAG-3'). Die mRNA mehrerer hundert Gene von *S. cerevisiae* wie von Säugern besitzt solche uORFs (Vilela *et al.*, 1998; Kozak, 1991). Da gerade Transkriptionsfaktoren als zentrale Regulationsproteine besonders häufig vertreten sind, könnte auch die Expression des Transkriptionsfaktors Efg1p posttranskriptionell reguliert sein (siehe 4.3.1).

4.2 Sequenz des *EFG1*-Hauptpromotors

Als Promotor des langen *EFG1*-Transkriptes (*EFG1p*) wurde in dieser Arbeit ein 3,2 kb großes *BglIII/BamHI*-Fragment von Plasmid p607/2 verwendet. Dieses enthält den durch die Verstärkung der Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* isolierten *EFG1*-Klon des *C. albicans*-Stammes ATCC10231. Die Sequenz des *EFG1*-Promotors geht somit auf den Stamm ATCC10231 zurück, während für die Sequenzierung des *C. albicans*-Genomes der Stamm SC5314 verwendet wurde (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>). Die Sequenz der gesamten 5'-flankierenden Region von *EFG1* weicht in 63 von 4448 bp von der Genomsequenz von SC5314 ab. Drei abweichende Nukleotide liegen in der TATA-Box-Region des *EFG1*-Hauptpromotors (Abb. 10).

4.2.1 Der 5'-flankierende Bereich von *EFG1* stellt eine große intergenische Region dar

Wenn man die Sequenz des *EFG1*-Locus von ATCC10231 über die *BglIII*-Schnittstelle (-4448) hinaus mit der Sequenz von SC5314 ergänzt (CONTIG 4-2908), enthält die 5'-flankierende Region von *EFG1* über einen Bereich von ca. 10 kb keine offenen Leserahmen. Der erste ORF (größer als 100 AS) codiert ein Protein von 331 Aminosäuren

(ARF98). Die fünf größten offenen Leserahmen unterhalb von 100 Aminosäuren innerhalb dieser Region codieren für Proteine mit einer berechneten Größe von 83 AS, 82 AS, 72 AS, 68 AS und 65 AS. Somit umfaßt der 5'-flankierende Bereich von *EFG1* eine intergenische Region von 10 kb. In *S. cerevisiae* stellt die 5'-flankierende Region von *FLO11* mit 3,6 kb bisher die größte beschriebene intergenische Region dar (Rupp *et al.*, 1999). Als Oberflächenprotein ist Flo11p an der Ausprägung des filamentösen Wachstums von *S. cerevisiae* beteiligt, wobei in seinem ausgedehnten und komplexen Promotor sowohl Signale der MAPK-Kaskade als auch des cAMP-abhängigen Weges integriert werden. Die zehn größten intergenischen Regionen in *S. cerevisiae* werden von zwei weiteren an Entwicklungsprozessen beteiligte Genen 3'-flankiert. Die Größe des *HO*-Promotors (3082 bp) sowie des *IME1*-Promotors (2652 bp) deuten ebenfalls auf eine komplexe Steuerung ihrer Expression im Paarunstypwechsel bzw. der Meiose.

Die Größe der intergenischen 5'-flankierenden Region von *EFG1* bzw. des *EFG1*-Promotors bietet die Möglichkeit für eine ähnlich komplexe Regulation der Expression dieses zentralen Regulators der Morphogenese von *C. albicans*. Funktionelle Domänen und potentielle Bindemotive des *EFG1*-Promotors werden im Zusammenhang mit der Autoregulation diskutiert (siehe 4.5).

4.3 Funktion der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes

Die 5'-untranslatierte Region eines Transkriptes kann auf verschiedene Arten an der posttranskriptionalen Kontrolle der Genexpression beteiligt sein. Neben der Transkriptstabilität wird vor allem die Translationseffizienz des Transkriptes von der Sequenz bzw. der Sekundärstruktur einer 5'UTR beeinflusst (McCarthy, 1998). Wenngleich der CAP-Struktur am 5'-Ende einer mRNA als Schutz vor 5'-Exonukleaseaktivität die größte Bedeutung für die Stabilität beigemessen wird, so wurden auch Haarnadelstrukturen und Poly(G)-Sequenzen in 5'-untranslatierten Regionen als Stabilitätsdeterminanten eines Transkriptes beschrieben (Sagliocco *et al.*, 1994; Vega Laso *et al.*, 1993).

Auch RNA-bindende Proteine wie z.B. Pub1p regulieren den Abbau der mRNA (Stripecke *et al.*, 1994, Ruiz-Echevarria und Peltz, 2000). Die Regulation auf Translationsebene wird u.a. durch kurze offene Leserahmen (uORF) in der 5'UTR vermittelt. Die Expression des Transkriptionsfaktors *GCN4* von *S. cerevisiae* wird durch vier uORFs translational reguliert (McCarthy, 1998). Während uORF2 und uORF3 nicht essentiell für die Regulation sind, kommt uORF1 und uORF4 eine besondere Bedeutung zu. Die Initiation, Termination und Reinitiation der Translation wird sowohl durch die Sequenz der uORFs als auch durch ihren relativen Abstand zueinander reguliert. Auch die flankierenden Sequenzen von uORF1 und uORF4 beeinflussen aufgrund ihres A/U-Gehaltes bzw. G/C-Gehaltes die Reinitiationsrate und damit die Translation des offenen Leserahmens von *GCN4*. Ein weiteres Beispiel der translationalen Kontrolle durch uORFs stellen die beiden an der oxidativen Stressantwort beteiligten Transkriptionsfaktoren *YAP1* und *YAP2* von *S. cerevisiae* dar (Vilela *et al.*, 1998). Während der uORF von *YAP1* die Translation des stromabwärts gelegenen ORF von *YAP1* durch Reinitiation ermöglicht, wird die Translation von *YAP2* durch seine uORFs effizient blockiert. Zusätzlich zur Termination der Translation an den uORFs wird der Abbau des *YAP2*-Transkriptes beschleunigt. Demgegenüber wurde eine aktivierende Funktion des ersten uORFs auf die Translation des *stuA α* -Transkriptes beschrieben (Wu und Miller, 1997).

Die im folgenden Abschnitt diskutierte regulatorische Funktion der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes in der seruminduzierten Hyphenbildung von *C. albicans* könnte auf einer ähnlichen posttranskriptionalen Kontrolle der *EFG1*-Expression basieren, da die Abnahme des *EFG1*-Transkriptspiegels während der Hypheninduktion (Stoldt, 1995) nicht auf eine reduzierte Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors zurückgeführt werden kann (siehe 4.6.1).

4.3.1 5'UTR-Deletionsstämme zeigen Defekte im Hyphenwachstum

Um die potentielle Funktion der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes zu identifizieren, wurde die entsprechende Region am *EFG1*-Locus in mehreren Stämmen deletiert. Heterozygote Mutanten (BT1.1/1.2; BT2.1/2.2) zeigen keinen Defekt in der seruminduzierten Hyphenbildung (3.4.3), da sie über ein intaktes *EFG1*-Allel verfügen (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Die Fähigkeit, auf festem Serummedium Hyphen zu bilden, ist bei homozygoten Mutanten (BT3.1/3.2; BT4.1/4.2) hingegen deutlich eingeschränkt. Den stärksten Phänotyp zeigen die Stämme BT5.1/5.2, da in ihnen neben der kompletten Deletion eines *EFG1*-Allels durch die Deletion von *CPHI* eine alternative Hypheninduktion über den MAPK-Weg blockiert ist. Alle Mutanten, die ausschließlich *EFG1*-Transkripte ohne 5'UTR exprimieren, weisen einen extrem starken Defekt in der Hyphenbildung auf, der an den Phänotyp von *efg1*-Mutanten erinnert. Es erschien möglich, daß in den 5'UTR-Mutanten keine *EFG1*-Expression stattfindet. Da die Transkription des mutierten *EFG1*-Locus eindeutig nachgewiesen wurde (siehe 3.4.2), konnte ein die Translation inhibierender Einfluß der FRT-Sequenz am distalen Ende der verkürzten *EFG1*-Transkripte vermutet werden (siehe 3.4.4). In einem indirekten Ansatz über die Expression des Reportergens *RLUC*, zeigte sich jedoch, daß die potentielle Haarnadelstruktur der durch die Deletionsmethode eingefügten FRT-Sequenz keine inhibierende sondern eine aktivierende Wirkung auf die Expression des Reportergens ausübt (siehe 3.4.4). Die im Vergleich mit einem Reportergenkonstrukt ohne FRT-Sequenz erhöhte Luziferase-Aktivität eines Konstruktes mit FRT-Sequenz, kann mit einer Stabilisierung des Transkriptes erklärt werden. Die Transkriptanalyse in den heterozygoten 5'UTR-Mutanten zeigt im Vergleich mit dem langen *EFG1*-Transkript einen deutlich höheren Spiegel des kurzen *EFG1*-Transkriptes (Abb. 12). Da beide Transkripte unter der Kontrolle des *EFG1*-Hauptpromotors exprimiert werden, basiert die Differenz in den Transkriptspiegeln vermutlich auf einer durch die FRT-Sequenz bzw. ihrer Haarnadelstruktur veränderten Transkriptstabilität. Eine Stabilisierung durch die Einfügung einer Haarnadelstruktur in die 5'UTR wurde bereits für eine Luziferase-mRNA beschrieben (Linz *et al.*, 1997). Obgleich die Stabilisierung des verkürzten *EFG1*-Transkriptes nicht direkt auf die *RLUC*-mRNA übertragen werden kann, korreliert das Verhältnis der Reportergenaktivitäten der beiden Konstrukte von 1 zu 10 relativ gut mit dem Mengenverhältnis der beiden Transkripte in den heterozygoten 5'UTR-Mutanten (siehe 3.4.2). Aus dem Kontrollansatz läßt sich somit ableiten, daß eine effiziente Translation des verkürzten *EFG1*-Transkriptes in den 5'UTR-Mutanten stattfindet. Ihr Phänotyp beruht daher nicht auf einem totalen Verlust der *EFG1*-Expression, sondern auf der Deletion der 5'UTR.

Eine essentielle Funktion der 5'UTR für die durch *Efg1p* vermittelte Hyphenbildung steht allerdings im Widerspruch zur Komplementation des Hyphendefektes von *efg1*-Mutanten durch eine *PCK1p::EFG1*-Fusion, in der die 5'UTR fehlt (Sonneborn, 1999; Bockmühl, 2001). Die fehlende regulatorische Funktion der 5'UTR in der *PCK1p*-Fusion wird möglicherweise durch die starke Induktion des *PCK1*-Promotors durch die Hypheninduktionsmedien d.h. eine erhöhte *EFG1*-Expression kompensiert. Sollte die Funktion der 5'UTR in der Vermittlung einer effizienten Translation des langen *EFG1*-Transkriptes bestehen, könnte die potentiell geringere Translationsrate eines *EFG1*-Transkriptes ohne 5'UTR durch einen *PCK1p*-vermittelten, höheren Transkriptspiegel ausgeglichen werden. Ohne eine Analyse des *EFG1*-Transkriptspiegels kann eine die fehlende Funktion der 5'UTR kompensierende, erhöhte *PCK1p*-abhängige *EFG1*-Expression während der Hypheninduktion jedoch nur vermutet werden.

4.4 Promotorfunktion der 5'-flankierenden Region von *EFG1*

Der Promotor des kurzen *EFG1*-Transkriptes (Nebenpromotor) wurde von Leuker (1995) und Weide (1998) durch Fusionen mit dem Reportergen *LAC4* eingehend charakterisiert. Die Regulation des Nebenpromotors wird im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Hauptpromotors diskutiert (siehe 4.5.3). Obgleich das als Nebenpromotor verwendete 1200 bp große Fragment den Startpunkt des langen *EFG1*-Transkriptes beinhaltet, zeigt die Northern-Analyse der *LAC4*-Fusion (pCL76), daß nur ein kurzes *LAC4*-Transkript (ohne 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes) exprimiert wird (Abb. 17). Der Nebenpromotor vermittelt somit ausschließlich die Expression des kurzen *EFG1*-Transkriptes. Die Expression des mengenmäßig bedeutenderen langen *EFG1*-Transkriptes wird ausschließlich von der 5'-flankierenden Sequenz des Nebenpromotors vermittelt, die im Rahmen dieser Arbeit durch Fusionen mit den Reportergenen *LAC4* und *RLUC* als *EFG1*-Hauptpromotor (*EFG1p*) charakterisiert wurde.

4.4.1 Die *EFG1*-Expression wird durch einen Haupt- und einen Nebenpromotor reguliert

Die Northern-Analyse der *EFG1*-Expression zeigt, daß der *EFG1*-Locus zwei Transkripte generiert (Abb. 5). Da das kurze Transkript auch als Abbauprodukt des langen Transkriptes gebildet werden könnte, wurde mit verschiedenen *LAC4*-Fusionen die Promotorfunktion der 5'-flankierenden Sequenzen des ORF von *EFG1* analysiert. Sowohl die Fusion einer 1,2 kb großen proximalen 5'-flankierenden Sequenz (pCL76) als auch die Fusion eines 3,2 kb großen distalen Fragmentes (pBT-34) mit *LAC4* vermitteln die Expression eines 3,1 kb *LAC4*-Transkriptes, dessen Größe ungefähr dem ORF entspricht (Abb. 17). Die Expression von zwei *EFG1*-Transkripten basiert auf zwei distinkten Promotoren, wobei der Hauptpromotor gegenüber dem Nebenpromotor eine deutlich höhere Aktivität zeigt.

Die Fusion der gesamten 5'-flankierenden Sequenz von *EFG1* (4,4 kb) mit *LAC4* (pBT-20) bestätigt durch die Expression von zwei *LAC4*-Transkripten (3,1 kb; 4,3 kb) die Existenz von zwei Promotoren am *EFG1*-Locus (Abb. 17). Das lange *LAC4*-Transkript beinhaltet die 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes (Detektion mit 5'UTR-Sonde) und spiegelt somit dessen Expression wider, während die Expression des kurzen *LAC4*-Transkriptes auf der Aktivität des Nebenpromotors basiert. Das Mengenverhältnis der beiden *LAC4*-Transkripte entspricht jedoch nicht exakt dem der *EFG1*-Transkripte. Der relativ höhere Spiegel des kurzen *LAC4*-Transkriptes beruht auf einer höheren Transkriptstabilität. Eine durch einen unvollständigen *EFG1*-Hauptpromotor bedingte relativ schwächere Expression des langen *LAC4*-Transkriptes könnte den relativ erhöhten Spiegel des kurzen Transkriptes ebenfalls erklären. Diese Vermutung kann aufgrund der Größe des verwendeten Fragmentes in der Fusion (4,4 kb) jedoch ausgeschlossen werden. Eine aktivierende Domäne eines Promotors in mehr als 3,2 kb Abstand zum Transkriptionsstart wurde bisher in Hefe nicht beschrieben.

Die im Vergleich zum langen *EFG1*-Transkript schwächere Expression des kurzen *EFG1*-Transkriptes vom *EFG1*-Locus könnte auf der Hemmung des Nebenpromotors durch den stromaufwärts gelegenen Hauptpromotor basieren (Cullen *et al.*, 1984; Bateman *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 1989; Irninger *et al.*, 1992). Allerdings vermittelt der Nebenpromotor auch ohne den vorgelagerten Hauptpromotor eine deutlich geringere Expression als der Hauptpromotor in direkter Fusion mit *LAC4* (Abb. 17). Die Funktion zweier gleichgerichteter aufeinanderfolgender Transkriptionseinheiten („in tandem“) wird anhand des Vergleiches zwischen Haupt- und Nebenpromotor im weiteren diskutiert.

4.5 Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors

Den ersten Hinweis auf die negative Autoregulation der *EFG1*-Expression lieferte die Northern-Analyse der episomalen Überexpression von *EFG1* (Sonneborn, 1999; Abb. 18). Aufgrund der unterschiedlichen Größe der *EFG1*-Transkripte konnte zwischen episomaler und genomischer Expression differenziert werden. Die Überexpression des kurzen *EFG1*-Transkriptes unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors führte zu einem Verschwinden des langen *EFG1*-Transkriptes. Die genomische Expression des langen *EFG1*-Transkriptes wurde nahezu völlig reprimiert. Eine reprimierende Funktion der episomalen Überexpression auf das kurze *EFG1*-Transkript war nicht detektierbar aufgrund der identischen Größe der beiden kurzen (genomisch bzw. episomal exprimierten) Transkripte.

Da ein künstlich erzeugter hoher Efg1p-Spiegel eine Repression der genomischen *EFG1*-Expression bewirkt, kann auf eine negative Autoregulation des *EFG1*-Locus rückgeschlossen werden. Eine negative aber auch positive Autoregulation wurde für zahlreiche Transkriptionsfaktoren beschrieben. Während der *MyoD*-Promotor positiv autoreguliert wird (Dechesne *et al.*, 1994), unterliegt die Expression von *c-myc* einer negativen Autoregulation, welche auf der Bindung von c-Myc/Max-Heterodimeren an den *c-myc*-Promotor basiert (Facchini *et al.*, 1997). Weitere Beispiele für negative Autoregulation stellen das Homeobox-Gen *ATHB-2* von *Arabidopsis thaliana* und *SUF14* (auch *RPS3*) aus *Saccharomyces cerevisiae* dar, welches das ribosomale Protein S3 codiert (Ohgishi *et al.*, 2001; Hendrick *et al.*, 2001). Obgleich die Autoregulation meistens auf Transkriptionsebene durch eine direkte Bindung des Proteins an den eigenen Promotor vermittelt wird, scheint die autoregulatorische Repression der *SUF14*-Expression auf einer erhöhten Abbaurate der mRNA zu basieren, welche u.a. über die 5'UTR vermittelt wird. Eine ähnliche Funktion der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes in der Autoregulation von *EFG1* konnte über die Reporteranalysen des *EFG1*-Hauptpromotors ausgeschlossen werden (siehe 3.7.2).

Die Bedeutung der Autoregulation für zentrale Regulationsproteine zeigt sich auch am Transkriptionsfaktor Reb1p von *S. cerevisiae*. Ein konstantes Expressionsniveau wird über die direkte Bindung von Reb1p an drei verschiedene Domänen (A, B, C) in seinem eigenen Promotor sowohl durch negative als auch durch positive Autoregulation gewährleistet (Wang und Warner, 1998). Der Transkriptionsfaktor Amt1p von *Candida glabrata* wird ebenfalls autoreguliert (Zhou und Thiele, 1993). Die Verstärkung seiner Expression als Antwort auf hohe Kupferkonzentrationen beruht auf der Bindung von Amt1p an eine spezifische Sequenz (MRE: metal response element) in seinem eigenen Promotor. Da jedoch sowohl der Swi/Snf-Komplex als auch die Histonacetyltransferase Gcn5p für diese Regulation essentiell sind, wird eine regulatorische Funktion des Chromatin-Status in der *AMT1*-Autoregulation diskutiert (Koch *et al.*, 2001). Inwiefern ein ähnlicher Mechanismus der Autoregulation von *EFG1* zugrundeliegt, wurde in einer *sir2*-Mutante und mittels des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A untersucht (siehe 4.5.6).

Am Anfang der Untersuchungen zur *EFG1*-Autoregulation stand jedoch die Hypothese, daß sie wie in den meisten der zuvor beschriebenen Beispielen auf einer direkten Promotorbindung des überexprimierten Proteins basiert. Obgleich die Transkriptanalyse der *EFG1*-Überexpression nur auf eine Repression des *EFG1*-Hauptpromotors, der zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert war, hindeutete, zeigten Leuker (1995) und Weide (1997), daß auch der *EFG1*-Nebenpromotor negativ autoreguliert wird. Die Autoregulation des in dieser Arbeit charakterisierten *EFG1*-Hauptpromotors wird daher im Vergleich mit den Ergebnissen zum Nebenpromotor diskutiert.

4.5.1 Die Autoregulation von *EFG1* findet auf Transkriptionsebene statt

Anhand der Abnahme des genomisch exprimierten langen *EFG1*-Transkriptes bei episomaler *EFG1*-Überexpression konnte vermutet werden, daß die negative Autoregulation von *EFG1* auf Transkriptionsebene stattfindet. Im „Zwei-Plasmid-System“ konnte diese Annahme durch eine *LAC4*-Fusion für den *EFG1*-Nebenpromotor bestätigt werden (Tebarth, 1998). Auch die vom *EFG1*-Hauptpromotor vermittelte *LAC4*-Expression wird bei Überexpression von *EFG1* reprimiert (siehe 3.7.1). Die Fusion der gesamten 5'-flankierenden Region von *EFG1* (4,4 kb) mit dem Reporter gen erlaubte anhand der zwei *LAC4*-Transkripte die gleichzeitige Analyse beider Promotoren. Nach Induktion der *PCK1p*-vermittelten *EFG1*-Expression nimmt der Spiegel des langen *LAC4*-Transkriptes bis an die Nachweisgrenze ab, während der Spiegel des kurzen *LAC4*-Transkriptes in geringerem Maße sinkt (Abb. 20). Die Kontrolle mit einem Leervektor zeigt, daß dieser Effekt nicht auf das Medium, sondern auf die spezifische Überexpression von *EFG1* zurückgeführt werden kann. Die Repression des Hauptpromotors am *EFG1*-Locus konnte in der *LAC4*-Fusion in vergleichbarem Ausmaß nachvollzogen werden. Die nur leichte Abnahme des kurzen *LAC4*-Transkriptes korreliert hingegen nicht mit der achtfachen Repression der Aktivität des Nebenpromotors im „Zwei-Plasmid-Modell“ (Weide, 1998). Da die Repression der Reporteraktivität mit einer *LAC4*-Fusion des Nebenpromotors (ohne vorgelagerten Hauptpromotor) ermittelt wurde, könnte das schwächere (weniger als achtfache) Absinken des kurzen *LAC4*-Transkriptes auf einer Beeinflussung der Autoregulation durch den 5'-flankierenden Hauptpromotor beruhen. Um einen entgegengesetzten Einfluß des Neben- auf den Hauptpromotor auszuschließen, erfolgte die Analyse der autoregulatorischen Repression über die Enzymaktivität durch eine direkte Fusion des *EFG1*-Hauptpromotors an die Reporter gene *LAC4* und *RLUC*.

4.5.2 Der *EFG1*-Hauptpromotor unterliegt einer 10fachen negativen Autoregulation

In Fusion mit dem episomal exprimierten Reporter gen *LAC4* wurde eine 11,5fache Repression der Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors durch eine *PCK1p*-vermittelte Überexpression von *EFG1* ermittelt, in Fusion mit dem integrierten Reporter gen *RLUC* eine 9,2fache Repression. Diese ca. 10fache negative Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors korreliert relativ gut mit der starken Abnahme der unter seiner Kontrolle exprimierten langen *LAC4*- und *EFG1*-Transkripte bei *EFG1*-Überexpression (Abb. 18, 20).

Desweiteren erlaubt die Transkriptanalyse in Kombination mit der Messung der Reporter genaktivität den Schluß, daß die Autoregulation von *EFG1* eindeutig auf Transkriptionsebene reguliert wird. Eine Steuerung über den spezifischen Abbau der Transkripte der heterologen Reporter gene kann ausgeschlossen werden.

Das große Ausmaß der autoregulatorischen Repression ließ die Identifizierung von funktionellen Domänen in einer Deletionsanalyse des *EFG1*-Hauptpromotors möglich erscheinen. Das Niveau der episomalen Überexpression von *EFG1* unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors stellte jedoch aufgrund der variablen Kopiezahl des Plasmides einen Unsicherheitsfaktor dar, da nicht nur die Deletion potentieller Bindestellen im *EFG1*-Promotor, sondern auch eine unvollständige *EFG1*-Überexpression eine verminderte Autoregulation bedingen. Obgleich das Maß der Überexpression anhand des Pseudohyphen-Phänotyps beurteilt werden kann, wurde durch eine lange Induktionsphase (24 h) des *PCK1*-Promotors eine gleichmäßige und vollständige *EFG1*-Überexpression sichergestellt.

4.5.3 Ein minimaler 45 bp großer Promotor vermittelt eine vollständige autoregulatorische Repression

Die Deletionsanalyse des *EFG1*-Nebenpromotors führte zur Identifizierung von drei *cis*-regulatorischen Regionen, welche die autoregulatorische Repression des *EFG1*-Nebenpromotors steuern (Weide, 1997). Neben einer Autoregulation reprimierenden Domäne (ARD; -1200 bis -722) wurden eine distale (DAAD: -444 bis -389) und eine proximale (PAAD: -389 bis -283) Autoregulation aktivierende Domäne beschrieben. Die phasenspezifische Expression des „white“-spezifischen Gens *WH11* im Stamm WO-1 wird über zwei *cis*-aktivierende Sequenzen (DAS: -475 bis -388; PAS: -305 bis -270) in seinem Promotor mit einer vergleichbar großen Distanz zum Transkriptionsstart reguliert (Srikantha *et al.*, 1997). Die *cis*-regulatorischen Sequenzen des *EFG1*-Hauptpromotors wurden demgegenüber in unmittelbarer Nähe der TATA-Box lokalisiert (siehe 3.7.2).

Anhand der Deletionsanalysen mit den beiden Reportergen *LAC4* und *RLUC* ließ sich die funktionelle Domäne, welche eine vollständige Autoregulation vermittelt, auf einen Bereich von nur 45 bp einengen (3.7.2). Die gesamte 5'-flankierende Region dieses minimalen Promotors besitzt in der negativen Autoregulation von *EFG1* keine essentielle regulatorische Funktion, da ihre Deletion im *RLUC*-System (pBT-153) keine signifikante Abnahme der Repression bewirkt (3.7.2.3). Obgleich alle Deletionen im *RLUC*-System noch die zur Integration in den *EFG1*-Locus benötigte 5'-flankierende Region der *XmnI*-Schnittstelle des Promotors beinhalten (Abb. 25), erlaubt die Kombination mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse im *LAC4*-System die eindeutige Identifizierung dieser funktionellen Domäne. Innerhalb des minimalen Promotors scheint der unmittelbar stromaufwärts gelegene Bereich der TATA-Box (-10 bis -2) nicht an der Autoregulation beteiligt zu sein, da sowohl ein doppelter G-T-Austausch (pBT-120/-121) als auch seine völlige Deletion (pBT-148/-149) die Repression im *LAC4*-System nicht signifikant verändern (3.7.2.1). Da die Deletion pBT-156 im *RLUC*-System eine deutliche Abnahme der autoregulatorischen Repression zeigt (2,2 +/- 0,4), kann aus der Kombination mit den zuvor genannten Deletionen geschlossen werden, daß ein wesentlicher Teil der *EFG1*-Autoregulation von einem 16 bp großen Bereich (-26 bis -11 relativ zur TATA-Box) vermittelt wird.

Seine Sequenz 5'-GGGAGCAA~~AA~~CTAAGA-3' weist jedoch kein zuvor beschriebenes Bindemotiv oder ein Palindrom auf. Während bisher keine direkte Bindung von Efg1p an diese Sequenz über Verzögerungsgele nachgewiesen werden konnte, deuten die Ergebnisse einer CHIP-Analyse (Chromatin Immunopräzipitation) auf eine direkte oder indirekte Interaktion von Efg1p mit seinem eigenen Promotor (Doedt, 2000; pers. Mitteilung). Obgleich die Bindung von Efg1p an ein E-Box-Motiv vor kurzem *in vitro* nachgewiesen wurde (Leng *et al.*, 2001), liegt der Autoregulation von *EFG1* eine solche für bHLH-Proteine typische Interaktion nicht zugrunde, da die Deletion potentieller E-Boxen weder im Haupt- noch im Nebenpromotor ihre autoregulatorische Repression beeinflusst (Doedt, 2000; Daten nicht gezeigt).

Da nur die Deletion der TATA-Box des Hauptpromotors die negative Autoregulation vollständig aufhebt, scheint die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes unmittelbar an der Repression des *EFG1*-Hauptpromotors beteiligt zu sein. Eine die Autoregulation unterstützende Funktion könnte durch die Interaktion eines Repressorproteins, welches die benachbarte 16 bp-Sequenz (-26 bis -11) bindet, mit dem Initiationskomplex ausgeübt werden. Ein Modell zur Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors wird in Abschnitt 4.5.7 vorgestellt.

4.5.4 Phosphorylierungsmutanten von Efg1p zeigen volle Autoregulation

Die Überproduktion von zwei Efg1p-Varianten zeigte, daß die Imitierung eines dephosphorylierten Zustandes von Efg1p an Aminosäure 206 durch einen T/A-Austausch bzw. eines stetig phosphorylierten Zustandes an Aminosäure 248 durch einen T/E-Austausch, obgleich ihrer Effekte auf die Hyphenbildung, die autoregulatorische Repression des *EFG1*-Hauptpromotors nicht beeinflusst (siehe 3.7.3). Die Mutation an Threonin 206 führt beim Austausch zu Alanin zu einer deutlichen Reduktion der Hyphenbildung in Spider-Medium, während sie beim Austausch zu Glutamat beschleunigt wird (Bockmühl, 2001). Die Funktion von Efg1p in der Hyphenbildung scheint daher zumindest teilweise über die Phosphorylierung bzw. Aktivierung des Proteins an dieser PKA-Zielsequenz vermittelt zu werden. Der Glutamat-Austausch an einem unter den APSES-Proteinen konservierten Threonin (248) als potentieller Phosphorylierungsstelle führte zu einem völligen Verlust der Hyphenbildung auf Spider-Medium (Bockmühl, 2001). Da der ebenfalls beschriebene Verlust der Pseudohyphenbildung bei Überexpression im Autoregulationsexperiment mit dieser Variante nicht nachvollzogen werden konnte, könnte der Hyphendefekt auf einer zusätzlichen Mutation des Proteins über einen Mutagenese-Fehler basieren. Für die Untersuchungen zur Autoregulation wurde der Austausch auf einem *ADE2*-Vektor (pAPE(2)/*ADE*) eingefügt. Die Überexpression des T248E-Austausches führte ebenso wie die Wildtypform von Efg1p zu einem ausgeprägten Pseudohyphenphänotyp. Eine imitierte Phosphorylierung an Position 248 beeinflusst daher nicht die Fähigkeit von Efg1p, seinen eigenen Promotor zu reprimieren.

Die zur Aktivierung der Efg1p-Funktionen in der Morphogenese postulierten multiplen Phosphorylierungen durch mehrere Kinasen (Bockmühl, 2001) beeinflussen hinsichtlich der Positionen 206 und 248 nicht die *EFG1*-Autoregulation. Entweder benötigt die autoregulatorische Funktion von Efg1p eine Aktivierung an einer anderen Position, oder sie stellt eine vollkommen vom Aktivitätszustand unabhängige Eigenschaft des Proteins dar. Eine solche Trennung zwischen katalytischer Aktivität und autoregulatorischer Funktion wurde für die isogenen Pyruvatdecarboxylasen *PDC1* und *PDC5* von *S. cerevisiae* beschrieben. Die Expression von *PDC5* wird autoregulatorisch durch Pdc1p reprimiert. Mutante Allele von *PDC1* (pdc1-8, pdc1-14 und pdc1-51) besitzen trotz stark reduzierter katalytischer Aktivität ebenfalls diese autoregulatorische Funktion (Eberhardt *et al.*, 1998). Eine für Pdc1p diskutierte spezielle Konformation des Proteins zur Vermittlung der autoregulatorischen Funktion könnte auch der *EFG1*-Autoregulation zugrundeliegen.

Autoregulation und Hypheninduktion scheinen distinkte Funktionen von Efg1p zu sein.

4.5.5 Tup1p und Cap1p sind nicht an der Autoregulation beteiligt

Weder der Repressor filamentösen Wachstums Tup1p noch der in die Antwort auf oxidativen Stress involvierte Transkriptionsfaktor Cap1p sind an der autoregulatorischen Repression des *EFG1*-Locus beteiligt (siehe 3.7.4). Da beide Deletionsstämme nur einen Marker (*ura3*) besitzen, konnte die Autoregulation nicht indirekt im „Zwei-Plasmid-Modell“, sondern nur direkt auf Transkriptionsebene untersucht werden. Die aufgrund der modifizierten Bindestellen des *S. cerevisiae*-Homologen Yap1p im *EFG1*-Hauptpromotor vermutete Beteiligung von Cap1p am Prozeß der *EFG1*-Autoregulation, wurde nicht bestätigt, da die Repression des genomischen *EFG1*-Locus durch Überexpression von *EFG1* in einer *cap1*-Mutante (DSY1346) nachvollzogen wurde (Abb. 27).

Desweiteren liegen die potentiellen Bindestellen (Abb. 10) nach den Ergebnissen der Deletionsanalyse außerhalb der für die Autoregulation essentiellen Region (Abb. 25).

In der *tup1*-Mutante (BCa2-9) zeigt sich im Hinblick auf die Autoregulation ebenfalls kein Unterschied zum Wildtyp. Das kurze *EFG1*-Transkript wird jedoch bei Repression der *PCK1p::EFG1*-Fusion im Vergleich mit dem langen Transkript stärker exprimiert (Abb. 27). Da in der Transkript-Analyse keine Unterscheidung zwischen genomisch und episomal exprimierten kurzem *EFG1*-Transkript möglich ist, könnte dies als ein Hinweis für eine Beteiligung von Tup1p an der Repression des *EFG1*-Nebenpromotors gewertet werden. Der hohe Spiegel des kurzen Transkriptes resultiert jedoch vermutlich aus einer unvollständigen Repression der *PCK1p*-vermittelten episomalen *EFG1*-Expression. Die Funktion von Tup1p bei der Repression des *PCK1*-Promotors wurde vor kurzem beschrieben (Braun *et al.*, 2001). Demnach beruht das verstärkte Signal des kurzen Transkriptes auf der episomalen *EFG1*-Expression, da in der *tup1*-Mutante eine vollständige Repression des *PCK1*-Promotors nicht möglich ist.

4.5.6 Die Deletion von *SIR2* verändert die genomische *EFG1*-Expression

Inwiefern von Sir2p regulierte Veränderungen der Chromatinstruktur am Mechanismus der *EFG1*-Autoregulation beteiligt sind, kann aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse der Transkript-Analyse zweier Transformanten nicht eindeutig beurteilt werden (siehe 3.7.5). Eine Transformante (Abb. 28, I.) zeigt ohne episomale *EFG1*-Überexpression die normale Verteilung von langem und kurzem *EFG1*-Transkript. Bei Induktion der Überexpression bleibt die Menge des langen Transkriptes jedoch konstant. Da keine Repression des Hauptpromotors stattfindet, scheint die Deletion von *SIR2* die Autoregulation von *EFG1* aufzuheben. Die andere Transformante zeigt ein völlig anderes Expressionsmuster. Unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingungen (ohne episomale *EFG1*-Überexpression) wird das kurze *EFG1*-Transkript stärker als das lange Transkript exprimiert, wobei das Signal des kurzen Transkriptes aus der genomischen Expression resultiert. Eine nicht ausreichende Repression der episomalen *EFG1*-Expression kann die starke Expression des kurzen Transkriptes nicht erklären, da die Induktion der *PCK1p*-vermittelten Expression in erwarteter Weise ein Verschwinden des langen Transkriptes bzw. autoregulatorische Repression bewirkt, obgleich genomisch exprimiertes kurzes Transkript dies nicht vermag. Der Verlust der autoregulatorischen Kompetenz der ersten Transformante kann daher nicht auf eine spezifische Wirkung von Sir2p zurückgeführt werden, da die zweite Transformante sie trotz *sir2*-Deletion besitzt. Vielmehr deutet die verstärkte genomische Expression des kurzen *EFG1*-Transkriptes in der zweiten Transformante auf einen *sir2*-Effekt für den gesamten *EFG1*-Locus hin. Die widersprüchlichen Expressionsmuster könnten einerseits auf eine erhöhte Rekombinationsrate in der *sir2*-Mutante zurückzuführen sein, da ein ständiger Wechsel des Karyotyps beschrieben wurde (Perez-Martin, 1999). Andererseits wird in Analogie zu *S. cerevisiae* eine Funktion von Sir2p in der Organisation der Chromatinstruktur von *C. albicans* diskutiert, die den häufigen Phänotypwechsell dieser Mutante zugrundeliegen soll und auch die ungewöhnliche Expression des *EFG1*-Locus erklären könnte. Der Deacetylase-Aktivität von Sir2p wird in den „Silencing“-Mechanismen von *S. cerevisiae* eine besondere Bedeutung beigemessen, da „stille“ Chromatin-Domänen einen hypoacetylierten Status aufweisen (Moazed, 2001). Der vor kurzem nachgewiesenen, mit der Deacetylierung von Histonen gekoppelten Spaltung von NAD bzw. Synthese von O-Acetyl-ADP-Ribose konnte noch keine Funktion im „Silencing“ zugeordnet werden (Tanny *et al.*, 1999). Die Funktion des Acetylierungsstatus' von Histonen konnte jedoch anhand der Analyse von 40 *S. cerevisiae*-Promotoren verdeutlicht werden (Deckert und Struhl, 2001). Eine differentielle Acetylierung bzw. Deacetylierung der Histone H3 und H4 vermittelt die Funktion von Aktivatoren (Gcn4p, Gal4p) und Repressoren (Tup1p), wobei Aktivierung auch ohne Acetylierung beobachtet wird.

Eine Deacetylierung des *EFG1*-Locus im Zuge seiner autoregulatorischen Repression kann aufgrund der Überprüfung mit dem Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A insofern ausgeschlossen werden, als daß die eingesetzte Konzentration die Repression des *EFG1*-Hauptpromotors nicht beeinflußt (siehe 3.7.5). Obgleich eine geringe episomale Expression von *EFG1* auch unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingungen beobachtet wird, führt erst die Induktion der Überexpression sowohl mit als auch ohne Trichostatin A zur vollen negativen Autoregulation. Obgleich die Deletion der Histon-Deacetylasen *HDA1* und *RPD3* die Expression des langen *EFG1*-Transkriptes im Stamm WO-1 und dessen Phänotypwechsel beeinflussen (Srikantha *et al.*, 2001), kann kein funktioneller Zusammenhang zwischen Autoregulation und Deacetylierung nachgewiesen werden. Während bei den Untersuchungen zur Deacetylase-Funktion im Phänotypwechsel Trichostatin A in einer Konzentration von 10 µg/µl in einem Volumen von 3 µl eingesetzt wurde (Klar *et al.*, 2001), erfolgte die Analyse der Autoregulation aufgrund des großen Kulturvolumens (30 ml) mit einer geringeren Konzentration [50 µg/ml]. Diese liegt aber noch deutlich höher als in anderen Studien ([10 µg/ml]; Grewal *et al.*, 1998).

4.5.7 Modell der Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors

Während der Autoregulation des *EFG1*-Nebenpromotors drei *cis*-regulatorische Domänen zugrundeliegen, die von Homo-/Heterodimeren von Efg1p bzw. unbekanntem Proteinen gebunden werden sollen (Weide, 1998), wird für die Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors eine *cis*-regulatorische Sequenz von 16 bp postuliert, die via Interaktion mit Efg1p von einem Repressor der *EFG1*-Expression spezifisch gebunden wird. Die reprimierende Funktion des Repressor(komplexes) könnte sowohl durch eine Protein/Protein-Wechselwirkung mit dem Initiationskomplex als auch aufgrund der geringen Distanz durch die sterische Behinderung der TATA-Box-Bindung vermittelt werden (Abb. 37).

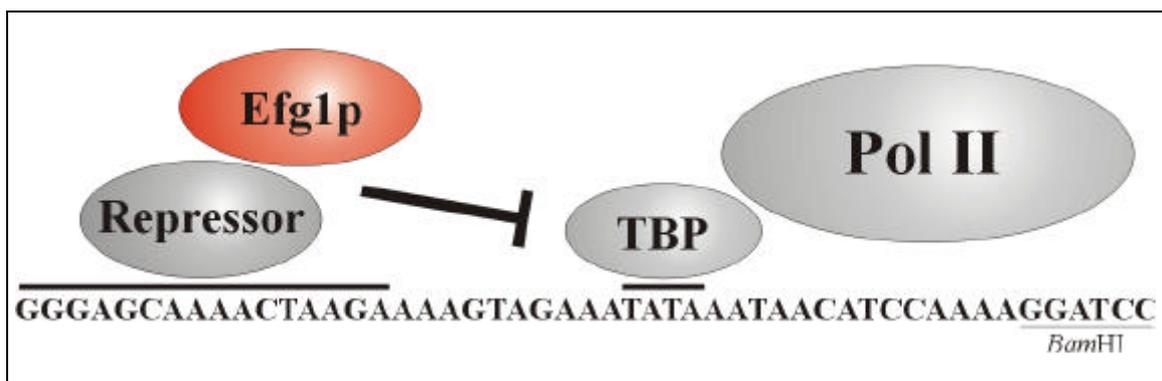


Abbildung 37: Modell der negativen Autoregulation des *EFG1*-Hauptpromotors

Bei episomaler Überexpression von *EFG1* wird ein Repressor über die Interaktion mit Efg1p an die *cis*-regulatorische Sequenz in unmittelbarer Nähe der TATA-Box rekrutiert. Dieser Repressor verhindert (in Wechselwirkung mit Efg1p) eine effektive Bindung der TATA-Box durch das TATA-Binde-Protein (TBP) und reprimiert so die Initiierung der Transkription von *EFG1*. Die *Bam*HI-Schnittstelle markiert das 3'-Ende des in den Deletionsanalysen verwendeten *EFG1*-Hauptpromotors.

4.6 Regulation der *EFG1*-Expression

Die Funktionen des Transkriptionsfaktors Efg1p in der Morphogenese von *C. albicans* werden einerseits über seine Aktivierung im cAMP-abhängigen PKA-Weg reguliert (Ernst, 2000a,b). Andererseits beeinflussen Variationen des *EFG1*-Expressionsniveaus in großem Ausmaß die Regulation des Dimorphismus. Während eine reduzierte Expression die Kompetenz zur Bildung echter Hyphen wie Chlamydosporen minimiert, induziert eine erhöhte Expression pseudohyphales Wachstum (Stoldt *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999a). Neben der Aktivierung des Proteins stellt die Expression des Gens eine zweite Regulations-ebene dar. Die negative Autoregulation von *EFG1* stellt einen Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer konstanten Expression dar.

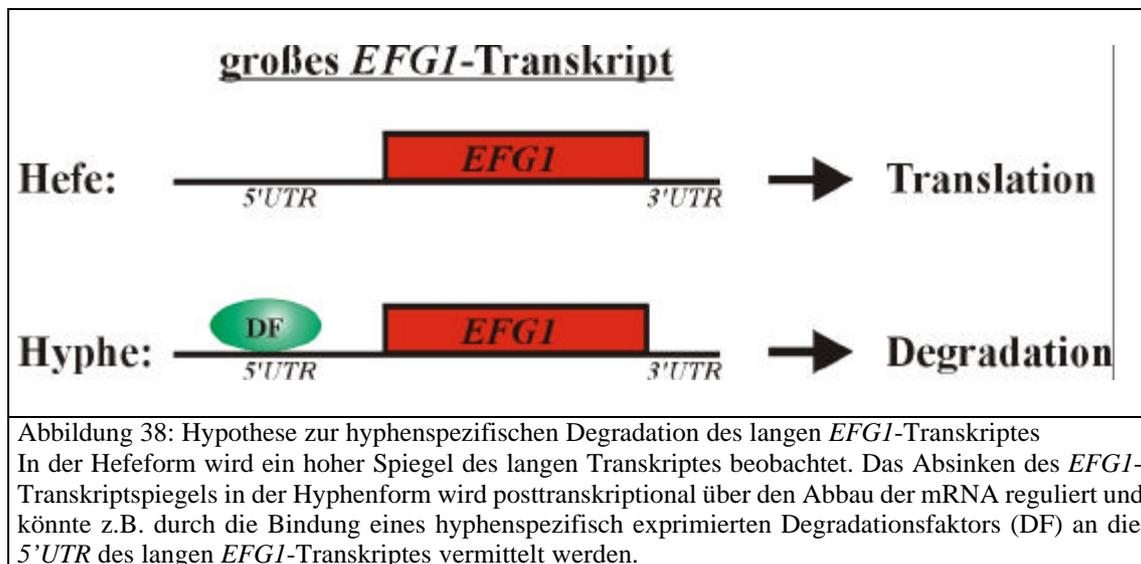
Während der Hypheninduktion und im „white/opaque“-Phänotypwechsel des Stammes WO-1 findet eine Regulation der *EFG1*-Expression ebenso statt wie unter *TPK1/TPK2*- bzw. *EFH1*-Überexpression. Die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors und der *EFG1*-Transkriptspiegel wurden in diesen Beispielen untersucht und werden im folgenden diskutiert.

4.6.1 Die Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors bleibt während der Hypheninduktion konstant

Die Induktion echter Hyphen unter verschiedenen Bedingungen führt zu einem starken Absinken des langen *EFG1*-Transkriptes (Stoldt *et al.*, 1997).

Nach seiner Identifizierung wurde in dieser Arbeit der Promotor des langen *EFG1*-Transkriptes in Fusion mit dem Reportergen *LAC4* während der Hyphenentwicklung analysiert. Im gesamten Verlauf der Induktion in Serum (10 %) zeigt sich keine Abnahme, sondern ein konstanter Verlauf der β -Galaktosidase-Aktivität bzw. der *EFG1p*-abhängigen Expression des Reportergens (Abb. 29). Die Abnahme des langen *EFG1*-Transkriptes während der mit Serum induzierten Induktion echter Hyphen korreliert daher nicht mit der Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors. Bei dieser Schlußfolgerung ist jedoch zu beachten, daß die Halbwertszeit des Lac4-Proteins nicht bekannt ist. Im Falle einer sehr hohen Stabilität des Reporterproteins ließe sich über den Versuchszeitraum von drei Stunden keine Abnahme der Enzymaktivität bzw. der Promotoraktivität nachweisen. Gegen diese Annahme spricht jedoch, daß bei Überproduktion von Tpk1p und Tpk2 über einen Zeitraum von sechs Stunden eine ca. sechsfach reduzierte Reporterengenaktivität bestimmt wurde (siehe 3.8.2). Daher erscheint der Rückschluß auf eine konstante Aktivität des *EFG1*-Hauptpromotors während der Hypheninduktion zulässig. Das Absinken des *EFG1*-Transkriptspiegels in diesem Prozeß würde demzufolge posttranskriptional reguliert. Eine solche Kontrolle wurde bereits für die Expression von *TEF3* (codiert einen Transkriptions-elongationsfaktor, Swoboda *et al.*, 1994) und *ADH1* (Alkoholdehydrogenase, Bertram *et al.*, 1996) in *C. albicans* beschrieben. Die zuvor beschriebene essentielle Funktion der 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes in der seruminduzierten Hyphenbildung (siehe 4.3) könnte in der Vermittlung des posttranskriptional regulierten Abbaus des Transkriptes bestehen. Eine reduzierte Stabilität des langen Transkriptes während der Hypheninduktion könnte z.B. auf destabilisierenden Elementen („stem-loop“, Poly(G)-Sequenz) in der 5'UTR basieren oder mit der Translation des uORFs (siehe 4.3) gekoppelt sein. Neben ihrem inhibierenden Einfluß auf die Translation können uORFs auch den Abbau der mRNA beschleunigen (Oliveira und McCarthy, 1995). Über diese Elemente scheint jedoch kein hyphenspezifischer Abbau des langen Transkriptes erreichbar.

Dieser könnte jedoch z.B. durch ein hyphenspezifisch exprimiertes RNA-bindendes Protein vermittelt werden. Über die Bindung eines solchen Proteins (Degradationsfaktor: DF) an eine spezifische Sequenz in der 5'UTR könnte der Abbau des langen *EFG1*-Transkriptes hyphenspezifisch beschleunigt werden (Abb. 38).



Überprüfen ließe sich die oben beschriebene Hypothese zur hyphenspezifischen Degradation durch die Bestimmung der Luziferase-Aktivität und des Transkriptspiegels einer in den *EFG1*-Locus integrierten Reporter-genfusion aus *EFG1*-Hauptpromotor, 5'UTR und *RLUC*. Der Spiegel eines unter Kontrolle des *EFG1*-Hauptpromotors exprimiertes *RLUC*-Transkriptes, welches die 5'UTR des langen *EFG1*-Transkriptes enthält, sollte während der seruminduzierten Hypheninduktion ebenso sinken wie der des langen *EFG1*-Transkriptes. Parallel dazu wäre ein Absinken der Luziferase-Aktivität zu erwarten.

4.6.2 Die Überexpression von *TPK1* und *TPK2* reprimiert den *EFG1*-Hauptpromotor

Die Funktionen des Transkriptionsfaktor Efg1p werden in einem cAMP-abhängigen Signalweg von der Proteinkinase A reguliert (Ernst, 2000a, b). Die Mutation einer potentiellen PKA-Zielsequenz (RVT) im Efg1-Protein (T206A; T206E) deutet auf eine direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch PKA (Bockmühl und Ernst, 2001). Dieser funktionelle Zusammenhang konnte durch die Überexpression der beiden katalytischen Untereinheiten der PKA (Tpk1p, Tpk2p) und ihrer Wirkung auf die *EFG1*-Expression indirekt bestätigt werden. Während eine Minimierung der *TPK1*-Expression bzw. eine Ausschaltung der *TPK2*-Expression in einer konditionalen *tpk1/tpk2*-Mutante die *EFG1*-Expression nicht beeinflusst, inhibiert die Überexpression von *TPK1* wie *TPK2* die Expression des Transkriptionsfaktors. Die Abnahme des langen *EFG1*-Transkriptes unter der Überexpression kann auf eine Repression des *EFG1*-Hauptpromotors zurückgeführt werden (siehe 3.8.2). Die ungefähr sechsfach reprimierte Promotoraktivität korreliert relativ gut mit der Senkung des *EFG1*-Transkriptspiegels, so daß eine veränderte mRNA-Stabilität als Ursache ausgeschlossen werden kann.

Diese Tpk1p/Tpk2p-abhängige Repression des *EFG1*-Hauptpromotors könnte einerseits auf einem Mechanismus basieren, der eine „Überaktivierung“ des PKA-Weges verhindert. Eine Aktivierung von Efg1p durch Tpk1p und Tpk2p vorausgesetzt, führt die Überexpression der beiden katalytischen Untereinheiten zu einer starken Aktivierung des Transkriptionsfaktors.

Als Folge wird über die Repression des *EFG1*-Promotors die Efg1p-Menge gesenkt, um die Aktivierung des PKA-Weges zu begrenzen.

Andererseits könnte die Tpk1p/Tpk2p-vermittelte Aktivierung von Efg1p direkt mit einer Repression der *EFG1*-Expression gekoppelt sein. In diesem Modell basierte die Signaltransduktion von PKA zu Efg1p lediglich auf einem „Aktivierungspuls“ zur Initiation der Hyphenbildung. Dieser „Puls“ wird begleitet oder gefolgt von der Repression der *EFG1*-Expression, da die Kaskade zur Entwicklung von Hyphen nur initial von aktiviertem Efg1p „angestoßen“ wird und im weiteren Ablauf keiner weiteren *EFG1*-Expression bedarf.

Die reprimierende Wirkung der Überexpression von *TPK1* und *TPK2* auf den *EFG1*-Hauptpromotor beweist zwar nicht den postulierten funktionellen Zusammenhang zwischen PKA und Efg1p, stellt aber einen weiteren Hinweis auf ihre Funktion in einem gemeinsamen Signalweg dar.

4.6.3 *EFH1*-Überexpression reprimiert den *EFG1*-Hauptpromotor

Aufgrund seiner Homologie zu Efg1p konnte Efh1p als zweites Protein von *C. albicans* in die Gruppe der APSES-Proteine eingeordnet werden (Bockmühl, 2001). Der pseudohyphale Überexpressionsphänotyp sowohl von *EFH1* als auch von *EFG1* deutet auf eine funktionelle Verwandtschaft der beiden bHLH-Proteine. Da die Überexpression von *EFG1* neben der Induktion von Pseudohyphen eine Repression des *EFG1*-Hauptpromotors bewirkt („negative Autoregulation“; siehe 4.5), wurde eine ähnliche Funktion für Efh1p vermutet und im „Zwei-Plasmid-Modell“ analysiert (siehe 3.8.3). Die Überexpression von *EFH1* unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors bewirkte ebenfalls eine Repression des *EFG1*-Hauptpromotors (ca. 3fach; Abb. 32). Im Vergleich mit der negativen Autoregulation von *EFG1* (10fach; Abb. 21, 25) war diese jedoch deutlich reduziert. Da die Funktionen von Efh1p in der Morphogenese von *C. albicans* noch weitgehend unbekannt sind, kann die reprimierende Funktion von Efh1p auf den *EFG1*-Hauptpromotor nicht in einen regulatorischen Zusammenhang gestellt werden.

Die Repression des *EFG1*-Promotors könnte insofern auf der großen Homologie zwischen Efh1p und Efg1p im Bereich der APSES-Domäne (65 %) basieren, als daß Efh1p in abgeschwächter Form den *EFG1*-Autoregulationsmechanismus vermittelt. Im Rückschluß kann nur die APSES-Domäne der autoregulatorischen Funktion zugrundeliegen, da sich die Homologie auf diese Region beschränkt.

4.6.4 Die Expression von *EFG1* korreliert mit dem „white/opaque“-Phänotypwechsel

Die Entwicklung des *EFG1*-Transkriptspiegels während der temperaturinduzierten Massenkonzersion von der „opaque“- zur „white“-Form deutet auf ein regulatorische Funktion des Transkriptionsfaktors im Phänotypwechsel des Stammes WO-1. Das lange *EFG1*-Transkript wird nicht nur „white“-spezifisch exprimiert, sondern auch von „opaque“-Zellen, die einen Wechsel des Phänotyps vollziehen (siehe 3.8.4). Zur Regulation des Phänotypwechsels im Verlaufe der Massenkonzersion wurde ein einzelnes Wechselereignis („master switch event“) während der zweiten Zellteilung nach 3-5 Stunden postuliert, welches die irreversible Abschaltung „opaque“-spezifischer Gene auslöst und die Expression „white“-spezifischer Gene induziert (Soll, 1997).

Die Expression des langen *EFG1*-Transkriptes korreliert mit diesem Wechselereignis insoweit, als daß Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie dem „opaque“-Typ zuzuordnen, aber auf molekularer Ebene schon auf die Entwicklung des „white“-Phänotyps festgelegt sind,

EFG1 exprimieren (Abb. 33). „Opaque“-Zellen, die stabil ihren Phänotyp bei 25°C aufrechterhalten, zeigen keine Expression des langen *EFG1*-Transkriptes (Sonneborn, 1999). Eine regulatorische Funktion von Efg1p im Phänotypwechsel wird noch durch weitere Beobachtungen unterstützt (Sonneborn *et al.*, 1999). Die episodale Überexpression von *EFG1* erhöht deutlich die Wechselrate vom „opaque“- zum „white“-Phänotyp, während eine minimale *EFG1*-Expression in Stamm CAI8 zur Ausprägung elongierter „opaque“-ähnlicher Zellen führt, die zwar das „opaque“-spezifische Gen *OP4* exprimieren, aber nicht die charakteristische Oberflächenstruktur („pimples“) zeigen. Die Expression von *EFG1* vermittelt nicht nur die Induktion des „white“-Phänotyps, sondern auch seine Aufrechterhaltung, da gegenüber der „opaque“-Form eine 38fach höhere Aktivität des *EFG1*-Promotors in der „white“-Form beschrieben wurde (Srikantha *et al.*, 2000).

Neben seiner essentiellen Funktion in der Ausprägung der beiden Phänotypen spricht jedoch gegen eine Funktion von Efg1p als „molekularer Schalter“ in diesem Phänotypwechsel, daß *efg1*-Mutanten des Stammes WO-1 einen temperaturinduzierten Wechsel von der „opaque“- zu einer unvollständigen „white“-Form vollziehen (Srikantha *et al.*, 2000). Sowohl die Induktion des „white“-spezifischen Gens *WH11* (bzw. Abschaltung von *OP4*) als auch der Verlust der „opaque“-spezifischen Oberflächenstruktur („pimples“) deuten auf einen Wechsel der *efg1*-Mutanten zum „white“-Phänotyp, obwohl eine „opaque“-ähnliche Zellform beobachtet wird. Die konstitutive Ausprägung elongierter Zellen wird auf die Deletion von *EFG1* zurückgeführt und bestätigt den Phänotyp der konditionalen *efg1*-Mutante in Stamm CAI8.

Ein vollständiger „white“-Phänotyp (Hefeform) ist daher an die ausreichende Expression des langen *EFG1*-Transkriptes gekoppelt, welches nicht in der stabilen „opaque“-Form auftritt. Eine minimale *EFG1*-Expression in Form eines kurzen Transkriptes (2,2 kb) wurde jedoch auch im „opaque“-Phänotyp nachgewiesen (Srikantha *et al.*, 2000). Eine Funktion konnte diesem im Vergleich mit dem langen Transkript der „white“-Form ca. 20fach schwächer exprimierten Transkript bisher nicht zugeordnet werden, da *efg1*-Mutanten in der „opaque“-Form keinen morphologischen Phänotyp zeigen. Potentielle Funktionen des kurzen Transkriptes in der Ausprägung physiologischer oder virulenzspezifischer Charakteristika von „opaque“-Zellen könnten Hinweise auf eine ähnliche Funktion des kurzen *EFG1*-Transkriptes in Stamm SC5314 liefern (siehe 4.1.1). Obgleich beide Transkripte nicht identische Startpunkte besitzen (Abb. 8), deutet sowohl die Existenz jeweils zweier Transkripte so unterschiedlicher Größe (3,2 kb und 2,2/2,1 kb) als auch ihr vergleichbares relatives Expressionsniveau (20 : 1) in den Stämmen WO-1 und SC5314 auf eine verwandte Funktion. Diese könnte auf posttranskriptionaler Ebene über eine unterschiedliche mRNA-Stabilität/-Lokalisation oder Translationseffizienz der beiden Transkripte definiert werden (siehe 4.3).

Die Ausprägung des „white“- und „opaque“-Phänotyps wird nicht nur direkt über den Transkriptionsfaktor Efg1p, sondern auch indirekt über Veränderungen der Chromatinstruktur reguliert, da die Deletion von Histon-Deacetylase codierenden Genen (*HDA1*, *RPD3*) den Phänotypwechsel beeinflusst (Srikantha *et al.*, 2001). *hda1*-Mutanten zeigen eine erhöhte Wechselrate von „white“ zu „opaque“, während *rpm3*-Mutanten eine höhere Wechselfrequenz in beide Richtungen und eine verminderte Expression „opaque“-spezifischer Gene (*OP4*, *SAP1*, *SAP3*) aufweisen. Die reduzierte Expression des langen „white“-spezifischen *EFG1*-Transkriptes in beiden Deletionsstämmen deutet auf eine übergeordnete Funktion der beiden Deacetylasen. Die „white“-spezifische Expression von *HDA1* und *RPD3* widerspricht hingegen einer essentiellen Funktion im Wechselereignis („master switch event“).

Inwiefern der „white/opaque“-Phänotypwechsel auf einer direkten Deacetylierung eines „master switch locus“ basiert oder indirekt über die Deacetylase-Funktion ein Regulator des „master switch event“ aktiviert wird, bleibt weiter ungeklärt.

4.7 *EFH1*-Expression im Phänotypwechsel

Die Analyse des *EFH1*-Transkriptspiegels im Verlauf einer Massenkonzersion zeigt ein phasenspezifisches Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors (Abb. 33). Während in der stabilen „opaque“-Form bei 25°C kein *EFH1*-Transkript nachweisbar ist, erfolgt nach dem Temperaturwechsel eine gegenüber der *EFG1*-Expression (2 h) leicht verzögerte Induktion der Expression eines 2,7 kb großen *EFH1*-Transkriptes (3 h). Dieser zeitliche Verlauf läßt eine direkte Induktion der *EFH1*-Expression durch Efg1p möglich erscheinen.

Im Gegensatz zur im weiteren Verlauf der Massenkonzersion stetig zunehmenden Expression von *EFG1* bleibt die Menge des *EFH1*-Transkriptes nahezu konstant, wobei seine Induktion (3 h) dem Phänotypwechsel (4 h) eindeutig vorrausgeht und eine regulatorische Funktion andeutet. Diese wird unterstützt durch die „white“-spezifische Expression eines kurzen *EFH1*-Transkriptes (2,5 kb). Es kann zusätzlich zum langen Transkript (2,7 kb) nur in Zellen nachgewiesen werden, die das „white“-spezifische Gen *WHI1* exprimieren. Eine phasenspezifische Expression zweier Transkripte eines Gens wurde neben *EFG1* (Srikantha *et al.*, 2000) auch für das eine Deacetylase codierende Gen *HOS3* beschrieben (Srikantha *et al.*, 2001). Während der „white“-Phänotyp ein 2,5 kb großes *HOS3*-Transkript exprimiert, wird in der „opaque“-Form ein 2,3 kb großes, deutlich schwächer exprimiertes Transkript nachgewiesen.

Die Phänotypen werden einerseits auf Transkriptionsebene durch die Expression phasenspezifischer Gene determiniert (Soll, 1997). Andererseits deutet die phasenspezifische Bildung verschiedener Transkripte eines Gens auf eine zusätzliche posttranskriptionale Ebene der Regulation. Die Expression von *EFH1* stellt neben der von *EFG1* und *HOS3* ein weiteres Beispiel für eine Regulation auf beiden Ebenen dar.

Eine regulatorische Funktion von Efh1p im Phänotypwechsel wird durch die Wirkung seiner Überexpression auf den „opaque“-Phänotyp unterstützt. Ebenso wie Efg1p forciert Efh1p bei *PCK1p*-vermittelter Überexpression den Wechsel zum „white“-Phänotyp (siehe 3.9). Da der destabilisierende Effekt der *EFG1*-Überexpression auf die „opaque“-Form deutlich stärker ausgeprägt ist (keine reinen „opaque“-Kolonien; Sonneborn, 1999), kann vermutet werden, daß Efh1p aufgrund seiner Homologie die regulatorische Funktion von Efg1p im Phänotypwechsel teilweise übernimmt. In diesem Fall würde die Funktion über die APSES-Domäne vermittelt, da sich die Homologie auf diesen Bereich beschränkt. Dem Effekt der *EFH1*-Überexpression kann aber auch eine eigene regulatorische Funktion von Efh1p zugrundeliegen, da die Expression des langen *EFH1*-Transkriptes in der Massenkonzersion während des Wechselereignisses („master switch event“) vor der Ausprägung des „white“-Phänotyps induziert wird (Abb. 33).

Obgleich weder Efg1p noch Efh1p den „molekularen Schalter“ des Phänotypwechsels darstellen, werden sie nicht nur phasenspezifisch exprimiert, sondern sie besitzen als Transkriptionsfaktoren beide regulatorische Funktionen in der Determinierung der beiden Phänotypen.

5. Zusammenfassung

Der Dimorphismus gilt als bedeutender Virulenzfaktor des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Die einzellige Hefeform dient der systemischen Ausbreitung im Wirt, während Filamente in Form von Hyphen und Pseudohyphen sowohl die Adhäsion an Epithelien als auch deren Penetration ermöglichen. Zentraler Regulator dieser morphogenetischen Prozesse ist der Transkriptionsfaktor Efg1p. Seine aktivierende Funktion in der Ausbildung echter Hyphen wird über die Proteinkinase A (PKA) gesteuert. Efg1p ist ebenfalls für die Bildung von Chlamydosporen notwendig, während Pseudohyphen als Folge einer *EFG1*-Überexpression gebildet werden.

Die Regulation der Expression des *EFG1*-Gens wurde in dieser Arbeit anhand von Transkriptanalysen und Reporterfusionen untersucht. Die Transkriptanalyse zeigte, daß der *EFG1*-Locus ein 3,2 kb großes Haupttranskript und ein 2,1 kb großes Nebentranskript generiert. Nach sequenzspezifischer Restriktion mittels RNaseH konnte eine 1,2 kb große 5'-untranslatierte Region (5'UTR) des ca. 20fach stärker exprimierten Haupttranskriptes identifiziert werden. Beide Transkripte wurden durch 5'RACE kartiert. Die Sequenzierung des *EFG1*-Hauptpromotors zeigte eine ungewöhnlich große intergenische Region (ca. 10 kb). Mutanten mit genomisch deletierter 5'UTR wurden konstruiert und wiesen eine defekte Hyphenbildung auf. Da in Reporterfusionen kein positiver Einfluß der 5'UTR auf den Transkriptspiegel nachgewiesen wurde, scheint die 5'UTR posttranskriptionell die Expression von *EFG1* zu beeinflussen.

Die Abnahme des genomisch exprimierten *EFG1*-Haupttranskriptes bei episodischer Überproduktion von Efg1p wurde durch Reporteranalysen auf eine ca. 10fache autoregulatorische Repression des *EFG1*-Hauptpromotors zurückgeführt. In einer Deletionsanalyse mit den Reportergenen *LAC4* und *RLUC* wurde die Umgebung der TATA-Box als cis-regulatorische Sequenz der negativen Autoregulation von *EFG1* identifiziert. Während eine Beteiligung von Tup1p, Sir2p, Cap1p sowie von Histondeacetylasen an der autoregulatorischen Repression ausgeschlossen werden konnte, wurde der *EFG1*-Hauptpromotor auch durch die Überproduktion des Efg1p-Homologen Efh1p sowie der beiden katalytischen Untereinheiten der PKA (Tpk1p, Tpk2p) reprimiert. Die Tpk-bedingte Repression unterstützt ein Modell, in dem PKA einerseits Efg1p aktiviert, andererseits aber die *EFG1*-Expression reprimiert; hierdurch und durch die *EFG1*-Autoregulation wird bei der Hypheninduktion ein „Aktivierungspuls“ erzeugt.

Eine weitere Konsequenz der Überexpression von *EFG1* und *EFH1* ist die Forcierung des Phänotypwechsels des *C. albicans*-Stammes WO-1 von der elongierten „opaque“-Form zur runden „white“-Form, der normalerweise spontan verläuft. Die Transkriptanalyse im Verlauf einer temperaturinduzierten Massenkonversion unterstützt eine regulatorische Funktion beider Transkriptionsfaktoren in der Etablierung des „white“-Phänotyps. Das *EFG1*-Haupttranskript wird spezifisch im „white“-Phänotyp exprimiert, aber auch von „opaque“-Zellen, die auf molekularer Ebene zur Entwicklung des „white“-Phänotyps determiniert sind. Somit reguliert Efg1p neben der Hyphen- und Chlamydosporenbildung auch den „white/opaque“-Phänotypwechsel.

Die Ergebnisse zeigen, daß die *EFG1*-Expression in komplexer Weise transkriptionell und posttranskriptionell reguliert wird. Hierdurch wird einerseits eine bestehende Morphogenese aufrechterhalten (Homeostase), andererseits bewirken Veränderungen des Efg1p-Spiegels morphogenetische Prozesse.

6. Literaturverzeichnis

Anderson, J.M., Cundiff, L., Schnars, B., Gao, M., Mackenzie, I. und Soll, D.R. (1989)

Hyphae formation in the white - opaque transition of *Candida albicans*.
Infect. Immun. **57**: 458 - 467

Anderson, J.M., Mihalik, K. und Soll, D.R. (1990)

Ultrastructure and Antigenicity of the Unique Cell Wall Pimple of the *Candida* Opaque Phenotype.
J. Bacteriol. **172**: 224 - 235

Alarco, A.M. und Raymond, M. (1999)

The bZIP transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **181**: 700-708

Arai, T., Mikami, Y. und Yokoyama, K. (1977)

Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils.
Sabouraudia. **15**: 171-177

Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R. und Metzberg, R. (1996)

Asm-1⁺, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development.
Genetics **144**: 991-1003

Ayer, D.E. und Eisenmann, R.N. (1993)

A switch from Myc::Max to Mad::Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation.
Gene Dev. **7**: 2110-2119

Ayer, D.E., Kretzner, L. und Eisenman, R.N. (1993)

Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity.
Cell **72**: 211-222

Backen, A.C. (2000)

Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*.
Yeast **16**: 1121-1129

Bailey, D.A., Feldman, P.F.J., Bovey, M., Gow, N.A.R. und Brown, A.J.P. (1996)

The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins.

J. Bacteriol. **278**: 5353-5360

Balan, I., Alarco, A.-M. und Raymond, M. (1997)

The *Candida albicans* *CDR3* gene codes for an opaque-phase ABC-transporter.
J. Bacteriol. **179**: 7210-7218

Banuett, F. (1998)

Signalling in the Yeasts: An Informational Cascade with Links to the Filamentous Fungi.
Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 249-274

Bateman, E. und Paule, M.R. (1988)

Promoter occlusion during ribosomal RNA transcription.
Cell **54**: 985-992

Beckerman, J., Chibana, H., Turner, J. und Magee, P.T. (2001)

Single-copy *IMH3* allele is sufficient to confer resistance to mycophenolic acid in *Candida albicans* and to mediate transformation of clinical *Candida* species.

Infect. Immun. **69**: 108-114

Berben, G., Legrain, M., Gilliquet, V. und Hilger, F. (1990)

The yeast regulatory gene *PHO4* encodes a helix-loop-helix motif.
Yeast **6**: 451-454

Bergen, M.S., Voss, E. und Soll, D.R. (1990)

Switching at the cellular level in the white - opaque transition of *Candida albicans*.
J. Gen. Microbiol. **136**: 1925 - 1936

Bertram, G., Swoboda, R.K., Gooday, G.W., Gow, N.A.R. und Brown, A.J.P. (1996)

Structure and Regulation of the *Candida albicans ADH1* Gene Encoding an Immunogenic Alcohol Dehydrogenase.
Yeast **12**: 115-127

Blackwood, E.M. und 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

Blasi, F., Carra, E., Vedittis, E., Masturzo, P., Bureri, E., Lambrinoudaki, M., Mirisola, G., Seidita, G. und Fasano, O. (1993)

The SCH9 protein kinase mRNA contains a long 5' leader with a small open reading frame.
Yeast **9**: 21-32

Bockmühl, D. (1998)

Strukturhomologe des Efg1p-Regulatorproteins von *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Bockmühl, D.P. und 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. (2001)

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

Bossier, P., Fernandes, L., Rocha, D. und Rodrigues-Pousada, C. (1993)

Overexpression of *YAP2*, coding for a new yap protein, and *YAP1* in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline.
J. Biol. Chem. **268**: 23640-23645

Bouchard, C., Staller, P. und 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

Braun, B.R. und Johnson, A.D. (1997)

Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor *TUP1*.
Science **277**: 105-109

Braun, B.R. und Johnson, A.D. (2000)

TUP1, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*.
Genetics **155**: 57-67

Braun, B.R., Kadosh, D. und Johnson, A.D. (2001)

NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction.
EMBO **20**: 4753-4761

Broach, J.R. (1991)

RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway.
TIG 7: 28-33

Brown, A.J.P., Bertram, G., Feldmann, P.J.F., Peggie, M.W. und Swoboda, R.K. (1991)

Codon utilisation in the pathogenic yeast *Candida albicans*.
Nucleic Acids Research 19: 4298

Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X. und Kumamoto, C. (1999)

Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene.
Mol. Microbiol. 34: 651-662

Bruckmann, A. Künkel, W., Härtl, A., Wetzker, R. und Eck, R. (2000)

A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth and virulence.
Microbiology 146: 2755-2764

Buffo, J., Herman, M.A. und Soll, D.R. (1984)

A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*.
Mycopathologia 85: 21-30

Buurman, C., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J., Odds, F.C. und Gow, N.A. (1998)

Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*.
PNAS 95: 7670-7675

Cahill, M.A., Ernst, W.H., Janknecht, R. und Nordheim, A. (1994)

Regulatory squelching.
FEBS 344: 105-108

Cai, M. und Davis, R.W. (1990)

Yeast centromere binding protein Cbf1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy.
Cell 61: 437-446

Calderone, R.A. (1994)

Molecular pathogenesis of fungal infections.
Trends in Microbiology 2: 461-463

Calderone, R.A. und Braun, P.C. (1991)

Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*.
Microbiol. Rev. 55: 1-20

Cameron B.J., und Douglas, L.J. (1996)

Blood group glycolipids as epithelial cells receptors for *Candida albicans*.
Inf. Immun. 64: 891-896

Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. und Sheperd, M.G. (1992)

Cloning and expression of *Candida albicans* *ADE2* and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen. Genet. 235: 453-457

Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. und Shepherd, M.G. (1990)

Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (*ARS*) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen. Genet. 221: 210-218

Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. und Sudbery, P.E. (1999)

The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics.
Mol. Microbiol. 34: 792-798

Cassone , A., Sullivan, P.A. und Sheperd, M.G. (1985)

N-Acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*.
Microbiologica **8**: 85-99

Castilla, R., Passeron, S. und Cantore, M.L. (1998)

N-acetyl-D-glucosamine induces germination in *Candida albicans* through a mechanism sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase.
Cell Signal **10**: 713-719

Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. und Martínez, J.P. (1998)

Cell wall and secreted proteins in *Candida albicans*: Identification, function and expression.
Microbiol. Molec. Biol. Rev. **62**: 130-180

Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B. und 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., Zhou, S., Wang, Q., Chen, X., Pan, T. und Liu, H. (2000)

Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*.
Mol. Cell. Biol. **20**: 8696-8708

Cook, J.G., Bardwell, L., Kron, S.J. und Thorner, J. (1996)

Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Genes Dev. **10**: 2831-2848

Cormack, B.P., Bertram, G., Gow, N.A.R., Falkow, S. und Brown, A.J.P. (1997)

Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*.
Microbiol. **143**: 303-311

Cormack, B.P., Ghorri, N. und Falkow, S. (1999)

An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells.
Science **285**: 578-582

Csank, C. Makris, K., Meloche, S., Schröppel, K., Rölinghoff, M., Dignard, D., Thomas, D.Y. und Whiteway, M. (1997)

Derepressed Hyphal Growth and Reduced Virulence in a VHI Family-related Protein Phosphatase Mutant of the Human Pathogen *Candida albicans*.
Mol. Biol. Cell **8**: 2539-2551

Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. und Whiteway, M. (1998)

Roles of the *Candida albicans* Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog, Cek1p, in Hyphal Development and Systemic Candidiasis.
Infect. Imm. **66**: 2713-2721

Csank, C. und Haynes, K. (2000)

Candida glabrata displays pseudohyphal growth.
FEMS Microbiol. Lett. **189**: 115-120

Cutler, J.E. (1991)

Putative virulence factors of *Candida albicans*.
Annu. Rev. Microbiol. **45**: 187-218

De Backer, M.D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R. und Luyten, W.H.M.L. (1999)

Transformation of *Candida albicans* by electroporation.
Yeast **15**: 1609-1618

Dechesne, C.A., Wei, Q., Eldridge, J., Gannoum-Zaki, L., Millasseau, P., Bougueleret, L., caterina, D. und Paterson, B.M. (1994)

E-Box- and MEF2-independent muscle-specific expression, positive autoregulation, and cross-activation of the chicken *MyoD* (*CMD1*) promoter reveal an indirect regulatory pathway.
Mol. Cell. Biol. **14**:5474-5486

Deckert, J. und Struhl, K. (2001)

Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors.
Mol. Cell. Biol. **21**: 2726-2735

Delbrück, S. (1994)

Transkriptregulation während der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Delbrück, S. und Ernst, J.F. (1993)

Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogen yeast *Candida albicans*.
Mol. Microbiol. **10**: 859-866

Doedt, T. (2000)

Untersuchungen zur Regulation und DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors Efg1p aus *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Höner, C.B. und Hollenberg, C.P. (1991)

An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera.
Yeast **7**: 691-692

Donelson, J.E. (1989)

DNA rearrangements and antigenic variation in African trypanosomes.
In *Mobile DNA*. Seite 763-782; Berg, D.E. und Howe, M.M.; Washington, DC: ASM

Douglas, L.J. (1995)

Adhesion-receptor interaction in the attachment of *Candida albicans* to epithelial cells.
Can. J. Bot. **73**: S1147-S1153

Dürrenberger, F., Wong, K. und Kronstad, J.W. (1998)

Identification of a cAMP-dependent kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. **95**: 5684-5688

Dutton, J.R., Johns, S. und Miller, B.I. (1997)

StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*.
EMBO J. **16**: 5710-5721

Eberhardt, I., Cederberg, H., Li, H., Konig, S., Jordan, F. und Hohmann, S. (1999)

Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity.
Eur. J. Biochem. **262**: 191-201

Enloe, B. (2000)

A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*.
J. Bacteriol. **182**: 5730-5736

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

Ernst, J.F. (2000a)

Regulation of dimorphism in *Candida albicans*, in: Contributions to Microbiology, vol. 5, *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts* 98-111. Hrsg. J.F. Ernst und A. Schmidt, Basel: Karger

Ernst, J.F. (2000b)

Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis.
Microbiol. **146**: 1763-1774

Facchini, L.M., Chen, S. und Penn, L.Z. (1994)

Dysfunction of the Myc-induced apoptosis mechanism accompanies c-myc activation in the tumorigenic L929 cell line.
Cell Growth & Differentiation **5**: 637- 646

Facchini, L.M., Chen, S., Marhin, W.W., Lear, J.N. und Penn, L.Z. (1997)

The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the *c-Myc* P2 minimal promotor.
Mol. Cell. Biol. **17**: 100 - 114

Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983)

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132**: 6-13

Feng, Q., Summers, E., Guo, B. und Fink, G. (1999)

Ras signalling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*.
J. Bacteriol. **181**: 6339-6346

Fernandes, L., Rorigues-Pousada, C. und Struhl, K. (1997)

Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions.
Moll. Cell. Biol. **17**: 6982-6993

Ferre-D'Amare, A.R., Prendergast, G., Ziff, E.B. und Burley, S.K. (1993)

Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain.
Nature **363**: 38-45

Fidel, P., Vazquez, J.A. und Sobel, J.D. (1999)

Candida glabrata : a review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease.
Clin. Microbiol.Rev. **12**: 80-96

Fonzi, W.A. und Irwin, M.Y. (1993)

Isogenic Strain Construction and Gene Mapping in *Candida albicans*.
Genetics **134**: 717-728

Fonzi, W.A. (1999)

PHR1 and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans.
J. Bacteriol. **181**: 7070-7079

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C.F. und Ghannoum, M.A. (1997)

Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*.
Microbiol. **143**: 331-340

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Ramos, C.F. und Ghannoum, M.A. (1998)

Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells.
Infect. Immun. **66**: 1783-1786

Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J. und Hostetter, M.K. (1998)

Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, *INT1*.
Science **279**: 1355-1358

Gale, C.A., Finkel, D., Tao, N., Meinke, M., McClellan, M., Olson, J., Kendrick, K. und Hostetter, M.K. (1996)

Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *C. albicans*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 357-361

Garreau, H., Hasan, r.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E. und Jacquet, M. (2000)

Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiology 146: 2113-2120

Gavrias, V., Adrianopolous, A., Gimeno, C.J. und Timberlake, W.E. (1996)

Saccharomyces cerevisiae *TEC1* is required for pseudohyphal growth.
Molec. Microbiol. 19: 1255-1263

Ghannoum, M.A., Swairjo, I. und Soll, D.R. (1990)

Variation in lipid and sterol contents in *Candida albicans* white and opaque phenotypes.
J. Med. Vet. Mycol. 28: 103 - 117

Ghannoum, M.A. (2000)

Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis.
Clin. Microbiol. Rev. 13: 122-143

Gietz, R.D. und Sugino, A. (1988)

New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites.
Gene 74: 527-534

Gietz, R.D. und Schiestl, R.H. (1995)

Transforming yeast with DNA.
Meth. Mol. Cell. Biol. 5: 255-269

Gillum, A.M., Tsay, E.Y.H. und Kirsch, D.R. (1984)

Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations.
Mol. Gen. Genet. 189: 179-182

Gimeno, C.J. und Fink, G.R. (1994)

Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development.
Mol. Cell. Biol. 14: 2100-2112

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1992)

Unipolar cell division in the yeast *S. cerevisiae* leads to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*.
Cell 58: 1077-1090

Glasgow, A.C., Hughes, K.T. und Simon, M.I. (1989)

Bacterial DNA inversion systems. In *Mobile DNA*. Herausg. Berg, D.E. und Howe, M.M., Seite 637-660; Washington, DC: American Society for Microbiology

Gow, N.A.R., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J.P., Fonzi, W.A., Chapman, T. und Kinsman, O.S. (1994)

A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6216-6220

Greenspan, D. (1994)

Treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients.
J. Am. Acad. Dermatol. 31: 51-55

Grewal, S.I.S., Bonaduce, M.J. und Klar, A.J.S. (1998)

Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast.
Genetics **150**: 563-576

Guhad, F. A., Jensen, H.E., Aalbeck, C., Csank, C., Mohamed, O., Harcus, D., Thomas, D.Y., Witheway, M. und Hau, J. (1998)

Mitogen activated protein kinase-defective *Candida albicans* is avirulent in a novel model of localized murine candidiasis.
FEMS Microbiol. Lett. **166**: 135-139

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557-580

Harshman, K.D., Moye-Rowley, W.S. und Parker, C.S. (1988)

Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4.
Cell **53**: 321-330

Hassan, B.A. und Bellen, H.J. (2000)

Doing the MATH: Is the mouse a good model for fly development?
Genes and Dev. **12**: 2623-2635

Henderson, S.L., Ryan, K. und Sollner-Webb, B. (1989)

The promoter-proximal rDNA terminator augments initiation by preventing disruption of the stable transcription complex caused by polymerase read-in.
Genes Devel. **3**: 212-223

Hendrick, J.L., Wilson, P.G., Edelman, I.I., Sandbaken; M.G., Ursic, D. und Culbertson, M.R. (2001)

Yeast frameshift suppressor mutations in the genes coding for transcription factor Mbf1p and ribosomal protein S3. Evidence for autoregulation of s3 synthesis.
Genetics **157**: 1141-1158

Herreros, E., Garcia-Saez, M.I., Nombela, C. und Sanchez, M. (1992)

A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation.
Mol. Microbiol. **6**: 3567 - 3574

Herskowitz, I. (1995)

MAP Kinase Pathways in Yeast: For Mating and More.
Cell **80**: 187-197

Holmes, A.R. und Shepherd, M.G. (1988)

Nutritional factors determine germ tube formation in *Candida albicans*.
J. Med. Vet. Mycol. **26**: 127-131

Hoppe-Tichy, T. (1997)

Systematische Pilzkrankungen: Klinik und antimykotische Therapie.
PZ **26**: 2161-2168

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

Hostetter, M.K. (1996)

Adhesion and morphogenesis in *Candida albicans*.
Pediatric Research **39**: 569-573

Hoyer, L.L. (2001)

The ALS gene family of *Candida albicans*.
Trends Microbiol. **9**: 176-180

Hubbard, M.J., Sullivan, P.A. und Shepherd, M.G. (1985)

Morphological studies of N-Acetylglucosamine induced germ tube formation by *Candida albicans*.
Can. J. Microbiol. **31**: 396-701

Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R. (1994)

Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*.
Mol. Microbiol. **14**: 87-99

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R. (1997)

Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes, *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *C. albicans albicans* attenuates virulence.
Infect. Immun. **65**: 3529-3528

Huber, D.H. und Rustchenko, E. (2001)

Large circular and linear rDNA plasmids in *Candida albicans*.
Yeast **18**: 261-272

Hull, C. M. und Johnson, A. D. (1999)

Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*.
Science **285**: 1271-1275

Hull, C. M., Raisner, R. M. und Johnson, A. D. (2000)

Evidence for mating of the 'asexual' yeast *Candida albicans* in a mammalian host.
Science **189**: 307-310

Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. jr., Nozawa, Y. und Ghannoum, M.A. (1995)

Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*.
Infect. Immun. **63**: 1993-1998

Irninger, S. Egli, C.M., Kuenzler, M. und Braus, G.H. (1992)

The yeast actin intron contains a cryptic promoter that can be switched on by preventing transcriptional interference.
Nucl. Acids Res. **20**: 4733-4739

Ishii, N., Yamamoto, M., Lahm, H., Iiumi, S., Yoshihara, F., Nakayama, H., Arisawa, M. und Aoki, Y. (1997a)

A DNA-binding protein from *Candida albicans* that binds to the RPG box of *Saccharomyces cerevisiae* and the telomeric repeat sequence of *C. albicans*.
Microbiol. **143**: 417-427

Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M. und Aoki, Y. (1997)

Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*.
Microbiology **143**: 429-435

Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1993)

HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis.
Cell **75**: 827-830

Jarvis, W.R. (1995)

Epidemiology of nosocomial infections, with emphasis on *Candida* species.
Clin. Infect. Dis. **20**: 1526-1530

Jiang, Y., Davis, C. und Broach J.R. (1998)

Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway.
EMBO J. **17**: 6942-6951

Jones, S. et al. (1994)

Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections.
J. Clin. Microbiol. **132**: 2869-2870

Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Cralson, M. und Johnson, A.D. (1992)

Ssn6-tup1 is a general repressor of transcription in yeast.
Cell **68**: 709-719

Kelly, R., Miller, S.M., Kurtz, M.B. und Kirsch, D.R. (1987)

Directed mutagenesis in *Candida albicans*: One-step gene disruption to isolate *ura3*-mutants.
Mol. Cell. Biol. **7**: 199 - 207

Kelly, R., Miller, S.M. und Kurtz, M.B. (1988)

One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*.
Mol. Gen. Genet. **214**: 24 - 31

Kennedy, M.J., Rogers, A.L., Hanselman, L.R., Soll, D.R. und Yancey, R.J. (1988)

Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotype.
Mycopathologia **102**: 149 - 156

Kennelly, P.J. und Krebs, E.G. (1991)

Consensus Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases.
J. Biol. Chem. **266**: 15555-15558

Klar, A.J.S., Srikantha, T. und Soll, D.R. (2001)

A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen *Candida albicans*.
Genetics **158**: 919-924

Kobayashi, S.D. und Cutler, J.E. (1998)

Candida albicans hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role?
Trends in Microbiology **6**: 92-94

Koch, K.A., Allard, S., Santoro, N., Cote, J. und Thiele, D.J. (2001)

The *Candida glabrata* Amt1 copper-sensing transcription factor requires Swi/Snf and Gcn5 at a critical step in copper detoxification.
Mol. Microbiol. **40**: 1165-1174

Köhler, J. und Fink, G.R. (1996)

Candida albicans strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development.
Proc Nat. Acad. Sci. USA **93**: 13223-13228

Kron, S.J. (1997)

Filamentous Growth in budding yeast.
Trends in Microbiology **5**: 450-454

Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W., Miller, S.M., Lai, M. und Kirsch, D.R. (1987)

Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*.
Mol. Cell. Biol. **7**: 209-217

Kvaal, C.A., Srikantha, T. und 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

Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L. und Friedman, L. (1975)

Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: Relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis.
Infect. Immun. **11**:1014-1023

- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A.R., Brown, A.J.P. und Thomas, D.Y. (1996)**
Signal transduction through homologs of the Ste20p and the Ste7p protein kinase can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*.
Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 13217-13222
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T. Fourest-Lieuvin, A., Segall, J.E. und Thomas, D.Y. (1997a)**
Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase.
EMBO **16**: 83-97
- Leberer, E., Thomas, D.Y. und Whiteway, M. (1997b)**
Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast.
Curr. Op. Gen. Dev. **7**: 59-66
- Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Harcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. und Thomas, D.Y. (1997c)**
Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p.
Current Biology **7**: 539-546
- Ledent, V. und Vervoort, M. (2001)**
The Basic Helix-Loop-Helix Protein Family: Comparative Genomics and Phylogenetic Analysis.
Gen. Res. **11**: 754-770
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. und Ghannoum, M.A. (1998)**
Cloning and disruption of *caPLB1*, a Phospholipase B Gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*.
J. Biol. Chem. **273**: 26078-26086
- Leng, P., Lee, P.R., Wu, H. und Brown, A.J.P. (2001)**
Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein.
J. Bacteriol. **183**: 4090-4093
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. und Heitman, J. (2000)**
Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**: 746-785
- Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1994)**
Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG codons.
Mol. Gen. Genet. **245**: 212-217
- Leuker, C.E., Hahn, A.M. und 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., Sonneborn, A., Delbrück, S. und Ernst, J.F. (1997)**
Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolcarboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*.
Gene **192**: 235-240
- Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D. und Ziff, E.B. (1994)**
c-Myc represses transcription *in vivo* by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II.
EMBO **13**: 4070-4079
- Lin, P. und Sherman, F. (1997)**
The unique hetero-oligomeric nature of the subunits in the catalytic cooperativity of the yeast Cct chaperonin complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 10780-10785

Linz, B., Koloteva, N., Vasilescu, S. und McCarthy, J.E.G. (1997)

Disruption of ribosomal scanning on the 5'-untranslated region, and not restriction of translation initiation *per se*, modulates the stability of nonaberrant mRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. **272**: 9131-9140

Liu, H., Köhler, J. und Fink, G.R. (1994)

Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation a *STE12* homolog.
Science **266**: 1723-1725

Liu, H., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1993)

Elements of the Yeast Pheromone Response Pathway Required for Filamentous Growth of Diploids.
Science **262**: 1741-1744

Lo, H.-S., Köhler, J., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und Fink, G.R. (1997)

Nonfilamentous *C. albicans* are avirulent.
Cell **90**: 939-949

Lo, W.-S. und Dranginis, A. M. (1998)

The cell surface flocculin Flo11 is required for Pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Biol. Cell **9**: 161-171

Loo, S. und Rine, J. (1994)

Silencers and domains of generalized repression.
Science **264**: 1768-1771

Lorenz, M.C. und Heitman, J. (1997)

Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, a G protein α homolog.
EMBO J. **16**: 7008-7018

Lorenz, M.C. und Heitman, J. (1998)

The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO **17**: 1236-1247

Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P. und Heitman, J. (2000)

The G Protein coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics **154**: 609-622

Losberger, C. und Ernst, J.F. (1989)

Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase.
Curr. Genet. **16**: 153-157

Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H. und 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

Madhani, D.H. und Fink, G.R. (1998)

The control of filamentous differentiation and virulence in fungi.
Trends in Cell Biology **8**: 348-353

Madhani, D.H. und Fink, G.R. (1998b)

The riddle of MAP kinase signaling specificity.
TIG **14**: 151-155

Madhani, H.D. und Fink, G.R. (1997)

Combinatorial Control Required for the Specificity of Yeast MAPK Signaling.
Science **275**: 1314-1317

Madhani, H.D., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1997)

MAP kinases with distinct functions impart signaling specificity during yeast differentiation.
Cell **91**: 673-674

Magee, B.B., Hube, B., Wright, R.J., Sullivan, P.J. und Magee, P.T. (1993)

The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members.
Infect. Immun. **61**: 3240-3243

Magee, P.T. (1997)

Which Came First, the Hypha or the Yeast?
Science **277**: 52-53

Magee, B. B. und Magee, P. T. (2000)

Induction of mating in *Candida albicans* by the constructon of *MTLa* and *MTLa* strains.
Science **289**: 310-313

Marichal, P., Vanden Bossche, H., Odds, F.C., Nobels, G., Warncock, D.W., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S und Mose-Larsen, P. (1997)

Antimicrobiol. Agents Chemother. **41**: 2229-2237

Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. und Estruch, F. (1996)

The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE).
EMBO J. **15**: 2227-2235

McCarthy, J.E.G. (1998)

Posttranscriptional control of gene expression in yeast.
MMBR **62**: 1492-1553

McCusker, J.H. und Davis, R.W. (1991)

The use of prolin as a nitrogen source causes hypersensitivity to, and allows more economical use of 5'FOA in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast **7**: 607-608

Meroni, G., Reymond, A.; Alcalay, M., Borsani, G., Tanigami, A., Tonlorenzi, R., Nigro, C.L., Messali, S., Zollo, M., Ledbetter, D.H., Brent, R., Ballabio, A. und Carrozzo, R. (1997)

Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E-Box and acts as a transcriptional repressor.
EMBO **16**: 2892 - 2906

Milatovic, D., Braveny, I., Cremer, J. und Bodey, G. [o.J. (1997)]

Candida-Infektionen: Neue Aspekte der Pathogenese, Therapie und Prophylaxe. Weiterbildungsprogramm Infektiologie-Klinikhygiene, Klinikum r.d. Isar, München

Miller, K.Y., Wu, J. und Miller, B.L. (1992)

StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*.
Genes & Development **6**: 1770-1782

Moazed, D. (2001)

Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing.
Current opinion in Cell Biol. **13**: 232-238

Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. und Shepherd, M.G. (1994)

Purification and characterization of two forms of N-Acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outerchain glycosylation.
Microbiol. **140**: 1543-1553

Montazeri, M. und Hedrick, H.G. (1984)

Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain.
Appl. Environ. Microbiol. **47**: 1341- 1342

Morrow, B., Srikantha, T. und Soll, D.R. (1992)

Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*.
Mol. Cell. Biol. 12: 2997-3005

Morrow, B., Ramsey, H. und Soll, D.R. (1994)

Regulation of phase - specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A.
J. Med. Vet. Mycol. 32: 287 - 294

Morschhäuser, J., Blum-Oehler, G. und Hacker, J. (1997)

Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies.
Med. Welt 48: 352-357

Morschhäuser, J., Michel, S. und Staib, P. (1999)

Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination.
Mol. Microbiol. 32: 547-556

Mösch, H.U., Roberts, R.L. und Fink, G.R. (1996)

Ras2 signals via Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5352-5356

Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D. und Parker, C.S. (1989)

Yeast *YAP1* encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins.
Genes Dev. 3: 283-292

Müller, P.P. und Hinnebusch, A. (1986)

Multiple AUG codons mediate translational control of *GCN4*.
Cell 45: 201-207

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S. D., Lassar, A.B., Weintraub, H. und Baltimore, D. (1989)

Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence.
Cell 58: 437-445

Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. und Aoki, Y. (2000)

Tetracycline regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*.
Infect. Immun. 68: 6712-6719

Navarro-García, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R. und Nombela, C. (1998)

A role for the MAP kinase gene *MKCl* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*.
Microbiology 144: 411-424

Niimi, M., Niimi, K., Tokunaga, J. und Nakayama, H. (1980)

Changes in cyclic nucleotide levels and dimorphic transition in *Candida albicans*.
J. Bacteriol. 142: 1010-1014

Niimi, M. (1996)

Dibutyl cyclic AMP-enhanced germ tube formation in exponentially growing *Candida albicans* cells.
Fungal Genetics and Biology 20: 79-83

Norbeck, J. und 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

Odds, F.C. (1988)

Candida and Candidosis, A Review and Bibliography; 2nd Edition, Ballière Tindall, London

Odds, F.C. (1994)

Pathogenesis of *Candida* infections.
J. Am. Acad. Dermatol. **31**: 2-5

Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I. und Aoyama, T. (2001)

Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*.
The plant journal **25**: 389-398

Oliveira, C.C. und McCarthy, J.E.G. (1995)

The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability: a short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. **270**: 8936-8943

Pan, X. und Heitman, J. (1999)

Cyclic cAMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **19**:4874-4887

Pan, X. und Heitman, J. (2000)

Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion.
Mol. Cell. Biol. **22**: 8364-8372

Pendrak, M.L. und Klotz, S.A. (1995)

Adherence of *Candida albicans* to host cells.
FEMS Microbiological Letters **129**: 103-114

Perez-Martin, J., Uria, J. A. und Johnson, A. D. (1999)

Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene.
EMBO J. **18**: 2580-2592

Petersen, R.F., Marinoni, G., Nielsen, M.L. und Piskur, J. (2000)

Molecular Approaches for Analyzing Diversity and Phylogeny among Yeast Species., in: Contributions to Microbiology, vol. 5, *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts* 15-35. Hrsg. J.F. Ernst und A. Schmidt, Basel: Karger

Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F. und 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. **40** : 1577-1583

Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M. und Nombela, C. (1996)

Understanding *Candida albicans* at the Molecular Level.
Yeast **12**: 1677-1702

Polymenis, M. und Schmidt, E.V. (1997)

Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G₁ cyclin *CLN3* in yeast.
Genes Dev. **11**: 2522-2531

Porta, A., Ramon, A.M. und Fonzi, W.A. (1999)

PRR1, the homolog of *Aspergillus nidulans palF*, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*.
J.Bacteriol. **181**: 7516-7523

Ptashne, M. und Gann, A.A.F. (1990)

Activators and targets.
Nature **346**: 329-331

Rademacher, F. (1998)

Chaperonine als dominant-negative Suppressoren von Ras-Phänotypen und der Morphogenese von *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Rademacher, F., Kehren, V., Stoldt, V.R. und Ernst, J.F. (1998)

A *Candida albicans* chaperonin subunit (CaCct8p) as a suppressor of morphogenesis and Ras phenotypes in *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Microbiology **144**: 2951-2960

Ramon, A.M., Porta, A. und Fonzi, W.A. (1999)

Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*.

J. Bacteriol. **181**: 7524-7530

Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A. und De Virgilio, C. (1998)

Saccharomyces cerevisiae cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase.

Genes Devel. **12**: 2943-2955

Reynolds, T.B. und Fink, G.R. (2001)

Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation.

Science **291**: 878-881

Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. und 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

Rikkerink, E.H.A., Magee, B.B. und Magee, P.T. (1988)

Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **170**: 895-899

Roberts, R.L. und Fink, G.R. (1994)

Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth.

Genes Dev. **8**: 2974-2985

Robertson, L.S. und Fink, G.R. (1998)

The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth.

Proc. Natl. Acad. Sci. **95**: 13783-13787

Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. und Fink, G.R. (2000)

The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function.

Proc. Natl. Acad. Sci. **97**: 5984-5988

Robinson, K.A. und Lopes, J.M. (2000)

Saccharomyces cerevisiae basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes.

Nuc. Acids Res. **28**: 1499-1505

Ruiz-Echevarria, M.J. und Peltz, S.W. (2000)

The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames.

Cell **101**: 741-751

Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H. und Fink, G. (1999)

MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene.

EMBO J. **18**: 1257-1269

Rutschenko-Bulgac, E.P., Sherman, F. und Hicks, J.B. (1990)

Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **172**: 1276-1283

Sabie, F.T. und Gadd, G.M. (1992)

Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*.

Mycopath. **119**: 147-156

Sagliocco, F., Zhu, D. Vega Laso, M.R., McCarthy, J.E.G., Tuite, M.F. und Brown, A.J.P. (1994)

Rapid mRNA degradation in yeast can proceed independently of translational elongation.

J. Biol. Chem. **269**: 18630-18637

Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch E.F. (1988)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour, NY

Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C. und Gow, N.A.R. (1994)

Deletion of the secretory aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5 and SAP6 causes attenuated virulence.

Infect. Immun. **65**: 3539-3546

Santos, M.A.S. und Tuite, M.F. (1995)

The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*.

Nucleic. Acids Res. **23**: 1481-1486

Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T. und Wigler, M. (1986)

Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*.

Proc. Natl. Acad. Sci. **83**: 9303-9307

Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E. und Hube, B. (2000)

Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis.

J. Invest. Dermatol. **114**: 712-717

Schmitt, E.M., Brown, T.A. und Trumpower, B.L. (1990)

A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*.

Nucleic Acids Res. **18**: 3091

Schnell, N., Krems, B. und Entian, K.D. (1992)

The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homolog, is involved in oxygen metabolism.

Curr. Genet. **21**: 269-273

Shenhar, G. und 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

Sheperd, M.G. und Sullivan, P.A. (1983)

C. albicans germ-tube formation with immobilized GlcNAc.

FEMS Microbiol. Lett. **17**: 167-170

Sheperd, M.G., Poulter, R.T.M. und Sullivan, P.A. (1985)

Candida albicans: biology, genetics, and pathogenicity.

Ann. Rev. Microbiol. **39**: 579-614

Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1986)

Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour NY

Shrivastava, A., Yu, J., Artandi, S. und 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

Slutsky, B. et al. (1985)

High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*.
Science **230**: 666-669

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. und 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. und Garret, S. (1998)

Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation.
EMBO J. **17**: 3556-3564

Soll, D.R. (1988)

High-frequency switching in *Candida albicans* and its relationship to vaginal candidiasis.
Am. J. Obstet. Gynecol. **158**: 997-1001

Soll, D.R., Anderson, J. und Bergen, M. (1991)

The developmental biology of the white - opaque transition in *Candida albicans*.
In The Molecular Biology of *Candida albicans*, pp. 20 -45; R. Prasad; Springer, Berlin

Soll, D.R., Morrow, B. und Srikantha, T. (1993)

High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*.
Trends Genet. **9**: 61-65

Soll, D.R. (1997)

Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*.
Microbiol. **143**: 279 - 288

Sonneborn, A. (1999)

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Efg1p und der Proteinkinase A (CaTpk2p) für die Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Sonneborn, A., Bockmühl, D.P. und Ernst, J.F. (1999a)

Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator.
Infect. Immun. **67**: 5514-5517

Sonneborn, A., Tebarth, B. und Ernst, J.F. (1999b)

Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator.
Inf. Immun. **67**: 4655-4660

Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerards, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., und Ernst, J.F. (2000)

Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*.
Mol. Microbiol. **35**: 386-396

Southern, E.M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by DNA electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-517

Srikantha, T. und Soll, D.R. (1993)

A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*.
Gene **131**: 53 - 60

Srikantha, T., Morrow, B., Schröppel, K. und Soll, D.R. (1995)

The frequency of integrative transformation at phase specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state.
Mol.Gen.Genet. **246**: 342-352

Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W.W., Tsai, L.K., Laughlin, L.A., Gorman, J.A. und Soll, D.R. (1996)
The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression.

J. Bacteriol. **178**: 121-129

Srikantha, T., Tsai, L.K. und Soll, D.R. (1997)

The *WH11* gene of *Candida albicans* is regulated in two distinct developmental programs through the same transcription activation sequences.

J. Bacteriol. **179**: 3837 - 3844

Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K. und 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

Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J.S. und Soll, D.R. (2001)

The Histone Deacetylase Genes *HDA1* and *RPD3* Play Distinct Roles in Regulation of High-Frequency Phenotypic Switching in *Candida albicans*.

J. Bacteriol. **183**: 4614- 4625

Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L. und Sundstrom, P. (1999)

Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1.

Science **283**: 1535-1538

Steinmetz, H.T. (1996)

Candidamykosen in der Intensivmedizin.

Mykosen **1**: 1-19

Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1997)

Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi.

EMBO J. **16**: 1982-1991

Strickling, B. (1996)

Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsfaktors Hyd1p (Efg1p) aus dem pathogenen Pilz *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Stripecke, R., Oliveira, C.C., McCarthy, J.E. und Hentze, M.W. (1994)

Proteins binding to 5' untranslated region sites: a general mechanism for translational regulation of mRNAs in human and yeast cells.

Mol. Cell. Biol. **14**: 5898-5909

Sturtevant, J. und Calderone, R. (1997)

Candida albicans adhesins: biochemical aspects and virulence.

Iberamer. Micologia **14**: 90-97

Sundstrom, P. (1999)

Adhesins in *Candida albicans*.

Curr. Opin. Microbiol. **2**: 353-357

Swanson, J. und Koomey, L.J. (1989)

Mechanisms for variation of pili and outer membrane protein II in *Neisseria gonorrhoea*.

In *Mobile DNA*. Herausg. Berg, D.E. und Howe, M.M., S. 743-762; Washington, DC: ASM

Swanson, H.I., Chan, W.K. und Bradfield, C.A. (1995)

DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins.

J. Biol. Chem. **270**: 26292 - 26302

Sweet, S.P. und Douglas, L.J. (1991)

Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*.

J. Gen. Microbiol. **137**: 859-856

- Swoboda, R.K., Bertram, G., Colthurst, D., Tuite, M., Gow, N.A., Gooday, G.W. und Brown, A.J. (1994)**
Regulation of the gene encoding translation elongation factor 3 during growth and morphogenesis in *Candida albicans*.
Microbiol. **140**: 2611-2616
- Tanny, J.C., Dowd, G.J., Huang, J., Hilz, H. und Moazed, D. (1999)**
An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein is essential for gene silencing.
Cell **99**: 735-745
- Tebarth, B. (1998)**
Versuche zur Regulation des *EFG1*-Gens in dem pathogenen Pilz *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Thevelein, J.M. und de Winde, J.H. (1999)**
Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Microbiol. **33**: 904-918
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J.F. (1998)**
Multiple Functions of Pmt1p-mediated Protein O-Mannosylation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*.
J. Biol. Chem. **273**: 20837-20846
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumo, K. und Wigler, M. (1985)**
In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase.
Cell **40**: 27-36
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. und Wigler, M. (1987)**
Three Different Genes in *S. cerevisiae* Encode the Catalytic Subunits of the cAMP-Dependent Protein Kinase.
Cell **50**: 277-287
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P. und Wigler, M. (1988)**
SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits.
Genes Dev. **2**: 517-527
- Towbin, H., Staelin, T. und Gordon, J. (1979)**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350-4354
- Tzung, K. W. et al. (2001)**
Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*.
PNAS **13**: 3249-3253
- Uhl, M.A. und Johnson, A.D. (2001)**
Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*.
Microbiol. **147**: 1189-1195
- Vazquez-Torres, A. und Balish, E. (1997)**
Macrophages in resistance to candidiasis. Microbiol.
Mol. Biol. Rev. **61**: 170-192
- Vega Laso, M.R., Zhu, D., Sogliocco, F., Brown, A.J.P., Tuite, M.F. und McCarthy, J.E.G. (1993)**
Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader.
J. Biol. Chem. **268**: 6453-6462
- Vieira, J und Messing, J. (1991)**
New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins.
Gene **100**: 189-194

- Walhout, A.J.M., Gubbels, J.M., Bernardis, R., van der Vliet, P.C. und Timmers, H.T. (1997)**
c-Myc/Max heterodimers bind cooperatively to the E-Box sequences located in the first intron of the rat ornithine decarboxylase (*ODC*) gene.
Nucleic Acids Res. **25**:1493 – 1501
- Wang, K.L. und Warner, J.R. (1998)**
Positive and negative autoregulation of *REB1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **18**: 4368-4376
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R. und 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
- Watts, H.J., Cheah, F.S.H., Hube, B., Sanglard, D. und Gow, N.A.R. (1998)**
Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes.
FEMS Microbiol. Lett. **159**: 129-135
- Weide, M.R. (1997)**
Regulation des Transkriptionsfaktors Efg1p in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* und Etablierung eines *in vitro*-Modells der epithelialen Migration.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Weide, M.R. und Ernst, J.F. (1999)**
Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*.
Mycoses **42**: 61-67
- Wenzel, R.P. (1995)**
Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality.
Clin. Infect. Dis. **20**: 1531-1534
- Whelan, W.L. und Magee, P.T. (1981)**
Natural heterozygosity in *Candida albicans*.
J. Bacteriol. **145**: 896-903
- Whelan, W.L. und Soll, D.R. (1982)**
Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis
Mol. Gen. Genet. **187**: 477-485
- Wickes, B.L., Mayorga, M.E., Edman, U. und Edman, J.C. (1996)**
Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α -mating type.
Procl. Natl. Acad. Sci. **93**: 7327-7331
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., De-Cruz, P., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989)**
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strain for tolerance to cytosine methylation in plasmid strain and phage recombinants.
Nucl. Ac. Res. **17**: 3469-3478
- Wu, J. und Miller, B.L. (1997)**
Aspergillus asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression.
Nol. Cell. Biol. **17**: 6191-6201
- Xue, Y., Battle, M. und Hirsch, J.P. (1998)**
GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway.
EMBO J. **17**: 1996-2007

Yannisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985)

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.

Gene **33**: 103-119

Zimmermann, F.K. (1975)

Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Mut.Res. **31**: 71-86

Zhou, P. und Thiele, D.J. (1993)

Rapid transcriptional autoregulation of a yeast metalloregulatory transcription factor is essential for high-level copper detoxification.

Genes and Development. **7**: 1824 – 1835

7 Abkürzungen

A	Adenin	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600\text{nm}$
Amp	Ampicillin	³² P	Phosphorisotop
APSES	pilzspezifische bHLH-Domäne	PCR	Polymerasekettenreaktion
ARS	autonom replizierende Sequenz	PEG	Polyethylenglykol
AS	Aminosäure	PKA	Proteinkinase A
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Domäne	RLU	relative Licht-Einheiten
bp	Basenpaare	<i>RLUC</i>	Luziferase-Gen aus <i>R. reniformis</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. „bovine serum albumine“)	RNA	Ribonukleinsäure
C	Cytosin	RNAseH	RibonukleaseH
°C	Temperatur in Grad Celsius	SCAA	synthetisches Minimalmedium mit Casaminosäuren
CASA	Casaminosäuren	SD	synthetisches Minimal-medium mit Glukose
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>CEN</i>	Centromer	SGal	synthetisches Minimal-medium mit Galaktose
Ci	Curie	SLADH	Synthetisches Medium mit geringer Ammonium Menge
C-Quelle	Kohlenstoffquelle	STRE	stress responsive element (engl.)
<i>EFG1</i>	<i>EFG1</i> -Gen	T	Thymidin
<i>EFG1p</i>	<i>EFG1</i> -Promotor	TE	Tris-EDTA
Efg1p	Efg1-Protein	Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	Upm	Umdrehungen pro Minute
DIG	Digoxigenin	X-Gal	5-Brom-4Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid	YNB	Yeast nitrogen base (Hefe Stickstoff Basis)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
cDNA	komplemetäre		
DTT	1,4-Dithiothreitol		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
FOA	5'-Fluorotridinsäure		
g	Gramm		
G	Guanin		
Gal	Galaktose		
β -Gal	β -Galaktosidase		
GlcNAc	N-Acetylglukosamin		
HA	Hämagglutinin		
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid		
KAN	Kanamycin		
kb	Kilobasenpaare		
kDa	Kilodalton		
<i>LAC4</i>	β -Galaktosidase-Gen aus <i>K. lactis</i>		
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>		
log	logarithmisch		
M	Molar		
μ	mikro		
MAPK	<u>M</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase		
min	Minute		
ml	Milliliter		
mM	Millimolar		
MOPS	[3-(N-Morpholinopropan-Sulfonsäure)]		
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau		
nm	Nanometer		

Anhang I : Autoregulation im LAC4-System (3.7.2.1; 3.7.3)

Reporter-plasmid	Überexpressions-plasmid	β -Gal-Aktivität: A (S4D) [RLU/ μ g]	β -Gal-Aktivität: A (SCAA) [RLU/ μ g]	Repression: A(S4D)/A(SCAA)	mittlere Repression +/- Standardabweichung
pBT-34	pAPE(2)/ADE	0,0904	0,0055	16,4	11,5+/-3,6
		0,0138	0,0018	7,7	
		0,0082	0,00099	8,3	
		0,0288	0,0021	13,7	
pBT-61	pAPE(2)/ADE	0,0141	0,00186	7,6	9,9+/-2,9
		0,0332	0,00238	13,9	
		0,0305	0,003	10,2	
		0,003	0,0038	7,9	
pBT-62	pAPE(2)/ADE	0,0017	0,00035	4,9	8,9+/-3,5
		0,0087	0,008	10,9	
		0,0402	0,0027	14,9	
		0,0009	0,00019	4,7	
pBT-60	pAPE(2)/ADE	0,099	0,0077	12,9	10,7+/-1,6
		0,0099	0,001	9,9	
		0,0229	0,0025	9,2	
pBT-99	pAPE(2)/ADE	0,0761	0,0049	15,5	12,4+/-2,8
		0,5192	0,06	8,7	
		0,2593	0,0188	13,8	
		0,172	0,016	10,8	
		0,1	0,0066	15,2	
		0,7365	0,0697	10,6	
pBT-68	pAPE(2)/ADE	0,5209	0,2934	1,8	8,6+/-4,0
		0,1469	0,0189	7,8	
		0,8816	0,1138	7,7	
		0,5855	0,0484	12,1	
		0,60	0,066	9,1	
		0,79	0,0598	13,2	
pBT-107	pAPE(2)/ADE	2,1247	0,0839	25,3	13,4+/-9,6
		0,4509	0,0289	15,6	
		0,0648	0,0258	2,5	
		0,5094	0,0499	10,2	
pBT-120/121	pAPE(2)/ADE	0,0856	0,0065	13,2	17,2+/-5,6
		0,116	0,0055	21,1	
pBT-148/149	pAPE(2)/ADE	0,2496	0,0314	7,9	9,0+/-7,1
		0,0096	0,0039	2,5	
		0,094	0,0036	26,1	
		0,0234	0,0097	2,4	
		0,0267	0,0045	5,9	
pBT-34	pBT-55A/B	0,0016	0,00008	20,0	11,3+/-6,4
		0,0017	0,00013	13,1	
		0,0091	0,0014	6,5	
		0,0036	0,00075	4,8	
pBT-34	pBT-140/141	2,239	0,2512	8,9	13,8+/-5,2
		1,466	0,1828	8,0	
		1,072	0,063	17,0	
		0,7086	0,0349	20,3	
		1,8187	0,1892	9,6	
		2,5828	0,1709	15,1	
		2,1488	0,1996	10,8	
		1,6022	0,077	20,8	

Anhang II: Autoregulation im *RLUC*-System (3.7.2.3)

Reporter-plasmid	Überexpressions-plasmid	β -Gal-Aktivität: A (S4D) [RLU/ μ g]	β -Gal-Aktivität: A (SCAA) [RLU/ μ g]	Repression: A(S4D)/ A(SCAA)	mittlere Repression +/- Standardabweichung
pBT-100	pAPE(2)/ADE	0,106	0,0098	10,8	9,2 +/- 1,7
		0,0263	0,0035	7,5	
pBT-150	pAPE(2)/ADE	0,049	0,0085	5,8	10,1 +/- 6,2
		0,072	0,0126	5,7	
		0,4406	0,0233	18,9	
pBT-153	pAPE(2)/ADE	0,282	0,064	4,4	8,1 +/- 3,7
		0,7126	0,0609	11,7	
pBT-156	pAPE(2)/ADE	0,0374	0,0209	1,8	3,3 +/- 1,4
		0,0045	0,0018	2,5	
		0,0217	0,012	1,8	
		0,0058	0,0013	4,4	
		0,5495	0,1314	4,2	
		0,2361	0,0448	5,3	
		0,0749	0,157	0,5	
pBT-157	pAPE(2)/ADE	0,0066	0,0084	0,8	0,9 +/- 0,2
		0,0119	0,0113	1,1	
		0,0001	0,0001	1,0	

Anhang III: *EFG1p*-Repression durch *TPK1/TPK2*-Überexpression (3.8.2.)

Reporter-plasmid	Überexpressions-plasmid	β -Gal-Aktivität: A (S4D) [RLU/ μ g]	β -Gal-Aktivität: A (SCAA) [RLU/ μ g]	Repression: A(S4D)/ A(SCAA)	mittlere Repression +/- Standardabweichung
pBT-34	pBT-151	1,55	0,262	5,9	6,3 +/- 3,1
		0,3685	0,0366	10,1	
		0,0447	0,0171	2,6	
		0,1018	0,016	6,4	
pBT-34	pBT-152	0,4535	0,1238	3,7	5,9 +/- 2,9
		0,1345	0,0264	5,1	
		0,1619	0,016	10,1	
		1,697	0,3799	4,5	

Anhang IV: *EFG1p*-Repression durch *EFH1*-Überexpression (3.8.3.)

Reporter-plasmid	Überexpressions-plasmid	β -Gal-Aktivität: A (S4D) [RLU/ μ g]	β -Gal-Aktivität: A (SCAA) [RLU/ μ g]	Repression: A(S4D)/ A(SCAA)	mittlere Repression +/- Standardabweichung
pBT-34	pBT-145	0,409	0,100	4,1	3,4 +/- 0,8
		0,646	0,255	2,5	
		0,1188	0,0333	3,6	

Herrn Prof. Dr. J.F. Ernst danke ich für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen Ideen zu neuen Experimenten.

Herrn Prof. Dr. R. Wagner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und insbesondere der AG Ernst danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit in einer ausgezeichneten Arbeitsatmosphäre.

Besonders danke ich Yvonne Weber und Thomas Doedt für die Durchsicht des Manuskriptes und die konstruktive Kritik.

