

**Regulation der Morphogenese des
humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch
Komponenten eines cAMP-abhängigen Signalweges**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Dirk Paul Helmut Bockmühl
aus Wuppertal

Düsseldorf
2001

Groß sind die Taten des Herrn, zu erforschen von allen, die Lust an ihnen haben.

Psalm 111,2

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Korreferentin: Prof. Dr. E. Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 20.6.2001

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	10
2.2 Stämme, Medien und Anzucht.....	10
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	10
2.2.2 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	10
2.2.3 <i>C. albicans</i>	10
2.2.4 <i>S. cerevisiae</i>	11
2.2.5 Medien zur Anzucht von Hefen.....	12
2.2.6 Induktion von Hyphen bei <i>C. albicans</i>	12
2.2.7 Induktion von Chlamydosporen bei <i>C. albicans</i>	12
2.2.8 Selektion Uridin-auxotropher Mutanten von <i>C. albicans</i>	13
2.3 Verwendete Plasmide.....	13
2.3.1 Grundvektoren.....	13
2.3.2 Vektorkonstruktionen.....	14
2.3.2.1 Vorkonstruktionen.....	14
2.3.2.2 <i>EFGI</i> -Mutationen.....	14
2.3.2.3 GFP-Fusionen.....	14
2.3.2.4 Vektoren für das „Zwei-Hybrid“-System.....	15
2.3.2.5 <i>EFHI</i> -Vektoren.....	15
2.4 Synthetische Oligonukleotide.....	15
2.5 Präparation und Analyse von Nucleinsäuren.....	16
2.5.1 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	16
2.5.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe.....	16
2.5.3 Isolierung von RNA aus Hefe.....	17
2.5.4 Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration.....	17
2.5.5 Restriktion von Nucleinsäuren.....	17
2.5.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	17
2.5.7 Molekulargewichts- und Größenstandards.....	17
2.5.8. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	17
2.5.9. Markierung von Nucleinsäuren.....	18
2.5.10 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über Southern Blot-Analyse.....	18
2.5.11 Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über Nouthern Blot-Analyse.....	18
2.6 Einführung von Punktmutationen in DNA-Sequenzen.....	19
2.7 Transformation.....	19
2.8 Analyse von Proteinen.....	19
2.8.1 Antikörper.....	19
2.8.2 Herstellung von Rohextrakten aus Hefekulturen.....	19
2.8.3 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität.....	20
2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	20
2.8.5 Immunopräzipitation.....	20
2.8.6 Koimmunopräzipitation.....	21
2.8.7 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine über Western-Blot-Analyse.....	21
2.8.8 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen.....	22
2.8.8.1 Nachweis über Phosphatase-Behandlung.....	22

2.8.8.2 Nachweis über Antikörper.....	22
2.8.9 <i>in vivo</i> -Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenz.....	22
2.8.10 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durch „Zwei-Hybrid“-Experimente.....	23
2.9 Aufnahmemessungen.....	23
2.9.1 Uridin-Aufnahme.....	23
2.9.2 Glukoseaufnahme.....	24
2.10 Test auf Sensitivität gegen Chemikalien und Hitzeschock.....	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Charakterisierung von Tpk1p aus <i>C. albicans</i>.....	25
3.1.1 Homologievergleich von CaTpk1p zu anderen Tpk-Isoformen aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. albicans</i>	26
3.1.2 Überexpression von <i>TPK1</i>	27
3.1.3 Northern-Blot-Analyse der <i>tpk1</i> -Disruption.....	28
3.1.4 Auswirkung der <i>tpk1</i> -Disruption auf die Hyphenbildung.....	29
3.1.5 Auswirkung der <i>TPK</i> -Expression auf das Wachstum.....	30
3.1.6 Vergleich der Hyphenbildung von <i>tpk</i> -Disruptionsstämmen auf festen Medien.....	31
3.1.7 Hyphenbildung in Flüssigmedien.....	32
3.1.8 Einfluß von <i>tpk</i> -Deletionen auf das invasive Wachstum.....	34
3.1.9 Einfluß der Proteinkinase A auf die zelluläre Streßantwort.....	35
3.1.9.1 Osmotoleranz von <i>tpk</i> -Deletionsstämmen.....	35
3.1.9.2 Einfluß von <i>tpk</i> -Deletionen auf die Thermotoleranz von <i>C. albicans</i> ..	36
3.2 Regulation des Transkriptionsfaktors Efg1p.....	38
3.2.1 Mutagenese von Efg1p.....	38
3.2.1.1 Western-Blot-Analyse der Efg1-Varianten.....	39
3.2.1.2 Nachweis der Phosphorylierung von Efg1p.....	40
3.2.1.3 Nachweis der Phosphorylierung über Antikörper.....	41
3.2.1.4 Überexpression der Efg1-Austauschvarianten.....	42
3.2.1.5 Hyphenbildung von Efg1-Varianten auf festen Medien.....	43
3.2.1.6 Hyphenbildung von Efg1-Varianten in flüssigen Induktionsmedien...	44
3.2.1.7 Chlamydosporenbildung.....	45
3.2.1.8 Untersuchungen an C-terminal verkürzten Varianten von Efg1p.....	46
3.2.1.8.1 Western-Blot-Analyse der verkürzten Efg1-Varianten.....	47
3.2.1.8.2 Überexpression der verkürzten Efg1-Varianten.....	47
3.2.1.8.3 Hyphenbildung von verkürzten Efg1-Varianten.....	48
3.2.2 Regulation von Efg1p durch die Proteinkinase A.....	48
3.2.2.1 Epistase-Untersuchungen zur Komplementation von Hyphendefekten	49
3.2.2.2 Suppression des <i>TPK2</i> -assoziierten Hyphendefektes in flüssigen Induktionsmedien.....	51
3.2.2.3 Komplementation von Hyphendefekten durch die Efg1-Varianten T206A und T206E.....	51
3.2.2.4 Versuch des Nachweises der Interaktion von Efg1p und der Proteinkinase A.....	52
3.2.2.4.1 Zwei-Hybrid-Analyse der Interaktion von Efg1p und Tpk1/2p....	52
3.2.2.4.2 Koimmunopräzipitation von Efg1p und Tpk1/2p.....	53
3.2.3 Lokalisation von Efg1p.....	54
3.2.4 Einfluß von <i>EFG1</i> auf die Uridinaufnahme.....	55
3.3 Identifikation des Efg1p-Homologs Efh1p.....	57

3.3.1 Aufklärung der Basensequenz von <i>EFHI</i>	57
3.3.2 Homologievergleiche von Efh1p und Efg1p.....	59
3.3.3 Überexpression von <i>EFHI</i>	60
3.3.4 Zwei-Hybrid-Analyse von Efh1p.....	61
3.3.5 Suppression von Hyphendefekten durch <i>EFHI</i> -Überexpression.....	62
4 Diskussion	63
4.1 Charakterisierung von Tpk1p aus <i>C. albicans</i>	64
4.1.1 Tpk1p und Tpk2p sind die einzigen Tpk-Isoformen in <i>C. albicans</i>	65
4.1.2 Tpk1p ist ein Regulator der Hyphenbildung.....	67
4.1.3 Die zelluläre Streßantwort von <i>C. albicans</i> wird durch die Tpk-Isoformen negativ reguliert.....	69
4.2 Regulation des Transkriptionsfaktors Efg1p	71
4.2.1 Efg1p ist ein Phosphoprotein.....	71
4.2.2 Verschiedene Phosphorylierungen determinieren die Efg1p-Funktion.....	72
4.2.3 Der C-Terminus von Efg1p vermittelt pseudohyphales Wachstum bei Überexpression.....	76
4.2.4 Proteinkinase A und Efg1p regulieren die Hyphenbildung in einem gemeinsamen Signalweg.....	76
4.2.5 Efg1p ist an der Steuerung der Uridinaufnahme beteiligt.....	79
4.3 Identifikation des Efg1p-Homologs Efh1p	80
4.3.1 Efh1p ist neben Efg1p das zweite APSES-Protein aus <i>C. albicans</i>	81
4.3.2 Efh1p ist in die Regulation filamentösen Wachstums involviert.....	82
4.3.3 Efh1p bildet Homodimere.....	82
5 Zusammenfassung	84
6 Literaturverzeichnis	85
7 Abkürzungen	100

1 Einleitung

Die steigende Zahl von Humanmykosen macht *Candida albicans* als bedeutendsten Erreger dieser Infektionen zum Objekt intensiver Forschung. *C. albicans* kann als Schleimhautkommensale bei etwa 30% aller Gesunden oral oder gastrointestinal nachgewiesen werden (Milatovic *et al.*, 1996). Zu einer Infektion kommt es immer dann, wenn bestimmte Faktoren eine vermehrte lokale oder systemische Ausbreitung des Pilzes fördern. So kann es durch eine chronische Mazeration der Haut zur Windeldermatitis bei Säuglingen oder zu adipös bedingter Intertrigo kommen. Für das Auftreten von rezidivierenden vaginalen Candidamykosen wird eine lokal reduzierte Immunabwehr angenommen.

Im Gegensatz zu den meist harmlos verlaufenden und gut therapierbaren lokalen Infektionen, verlaufen systemische Candidosen in über 50% der Fälle tödlich. Dadurch betroffen sind in der Regel Patienten mit geschwächtem Immunsystem, etwa bei AIDS-Infektionen oder durch Einsatz von Chemotherapie und Immunsuppressiva. Wurden früher fast ausschließlich Bakterien als nosokomiale Erreger identifiziert, steigt seit einigen Jahren die Inzidenz von *Candida*-Spezies stetig an (Steinmetz, 1996). Mit einem Anteil von 50-70% der systemischen *Candida*-Infektionen stellt *C. albicans* dabei die am häufigsten isolierte *Candida*-Art dar.

Zur Bekämpfung von Candidosen stehen zahlreiche Therapeutika zur Verfügung, die auf unterschiedliche Weise in Wachstum oder Stoffwechsel des Pilzes eingreifen. In der Mehrzahl zielt dabei der antimykotische Angriff auf die Zellwand bzw. -membran. Polyene wie Nystatin oder Amphotericin B interagieren mit der pilzspezifischen Membrankomponente Ergosterol und erhöhen dadurch die Permeabilität der Membran, Imidazolderivate wie Ketocanazol, Itraconazol oder Clotrimazol hemmen die Ergosterolsynthese selbst.

Im Gegensatz zu Bakterien weisen Pilze als Eukaryonten im wesentlichen die gleichen zellulären Mechanismen auf wie der Mensch, so daß viele Ziele für Antiinfektiva, etwa die Nukleinsäure- und Proteinsynthese, für eine Therapie nicht in Frage kommen. Lediglich ein Nukleosidanalogen, 5-Fluorocytosin, wird therapeutisch angewendet. Im Gegensatz zum Menschen können Pilze diese Substanz zu 5-Fluoruracil umsetzen, dessen Metabolite letztlich die Thymidinsynthese hemmen. Während eine Behandlung lokaler Pilzinfektionen meist problemlos durchgeführt werden kann, ist eine orale Verabreichung bei systemischen Mykosen mit starken Nebenwirkungen verbunden, da die meisten der genannten Therapeutika nephro- und hepatotoxisch wirken. Hinzu kommt, daß das Auftreten von Resistenzen eine langfristige Therapie mit Azolen, Fluorocytosin oder Amphotericin B ebenfalls erschwert. Die genaue Kenntnis der zellulären Mechanismen auf molekularer Ebene könnte helfen, die Bedeutung von Pathogenitätsfaktoren bei *C. albicans* einzuschätzen und somit Angriffspunkte für neue Antimykotika zu finden.

Die mittlerweile abgeschlossene Sequenzierung des Genoms und die Möglichkeit des freien Zugriffs (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) erleichtert nicht nur das Verständnis der Biologie von *C. albicans*, sondern stellt darüber hinaus ein wichtiges Hilfsmittel für die molekulargenetische Arbeit mit diesem Pilz dar. Die Tatsache, daß das *C. albicans*-Genom diploid ist, erschwert hingegen die genetische Untersuchung. Erst die Deletion beider Allele erlaubt eine Aussage darüber, ob die fehlende Expression des deletierten Gens zu einem veränderten Phänotyp führt. Die bei *Saccharomyces cerevisiae* bewährten Methoden der klassischen Genetik, wie Kreuzungen und Tetradenanalysen, finden bei *C. albicans* keine Anwendung, da bislang kein sexueller Vermehrungszyklus nachgewiesen werden konnte. Zwar finden sich Gene, deren Homologe in *S. cerevisiae* für den Wechsel des Paarungstyps verantwortlich sind (Hull und Johnson, 1999), jedoch konnte lediglich unter experimentellen Bedingungen eine Rolle dieser Gene bei einer potentiellen sexuellen Vermehrung gezeigt

werden (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000). Ein weiteres Problem stellt der atypische Kodongebrauch von *C. albicans* dar: Das Basentriplett CUG kodiert nicht wie gewöhnlich Leucin, sondern Serin (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995), was dazu führt, daß viele heterolog verwendeten Gene (z.B. *lacZ* aus *Escherichia coli* oder *GFP* aus *Aequorea victoria*) nicht funktionell exprimiert werden.

Inzwischen sind vielfältige molekulargenetische Werkzeuge für die Arbeit mit *C. albicans* verfügbar. Die gebräuchlichste Methode zur Gendisruption verwendet einen wiederverwendbaren Auxotrophiemarker, der eine sequentielle Deletion beider Allele ermöglicht (Fonzi und Irwin, 1993, Morschhäuser *et al.*, 1999). Als Reportergene stehen, wie im Falle von GFP, kodonoptimierte Varianten zur Verfügung (Cormack *et al.*, 1997), oder es werden Gene wie das β -Galaktosidase kodierende Gen *LAC4* aus *Kluyveromyces lactis* benutzt, die keine CUG-Kodons besitzen (Leuker *et al.*, 1992). Ein anderes Hilfsmittel für genetische Untersuchungen stellen regulierbare Promotoren dar. Diese vermitteln in Abhängigkeit der Medienzusammensetzung eine unterschiedlich starke Genexpression. Beispiele für derartige Promotoren sind der *PCK1*-Promotor, der durch die verfügbare Kohlenstoffquelle reguliert wird (Leuker *et al.*, 1997) und der durch Methionin und Cystein reprimierbare *MET3*-Promotor (Care *et al.*, 1999). Vor kurzem konnte außerdem ein Tetracyclin-regulierter Promotor für *C. albicans*-Anwendungen etabliert werden (Nakayama *et al.*, 2000).

Mithilfe dieser Methodik ist das Wissen um die molekulare Biologie von *C. albicans* in den letzten Jahren stetig gewachsen. Insbesondere Faktoren, die die Pathogenität von *Candida* beeinflussen, stehen dabei im Mittelpunkt des Interesses, weil diese potentielle Ziele für neue Antimykotika darstellen.

Mehrere Eigenschaften von *C. albicans* werden als mögliche Virulenzfaktoren diskutiert. Das sogenannte „phenotypic switching“ beinhaltet verschiedene Umstellungen in morphologischer und physiologischer Hinsicht. Dieses Phänomen spielt bei diversen Infektionskrankheiten eine Rolle; die Phasenvariation bei *Salmonella typhimurium*, die zu einem Wechsel der Oberflächenantigene führt, ist eines der bekanntesten Beispiele (Glasgow *et al.*, 1989). Bei *C. albicans* finden sich verschiedene Phänomene, die mit dem „phenotypic switching“ im Zusammenhang stehen. Im Stamm WO-1 läßt sich ein reversibler Wechsel zwischen zwei Zellformen beobachten, die als „white“ und „opaque“ bezeichnet werden (Slutsky *et al.*, 1987). Während die Zellen des „white“-Phänotyps eine normale Hefemorphologie aufweisen, sind die „opaque“-Zellen stäbchenförmig. Hintergrund dieses Wechsel ist eine differentielle Expression phasenspezifischer Gene, wobei kürzlich gezeigt werden konnte, daß die NAD-abhängige Deacetylase Sir2p (deren *S. cerevisiae*-Homolog in die Kontrolle des Paarungstyps involviert ist) eine wichtige Rolle bei dieser Regulation spielt (Perez-Martin *et al.*, 1999). Diese phasenspezifische Genregulation betrifft nicht nur morphologische Phänotypen, sondern hat auch Effekte auf physiologischer Ebene, z.B. in bezug auf die Sensitivität gegenüber Antimykotika (Soll *et al.*, 1993) oder auf die Sekretion von sauren Aspartatproteasen (Morrow *et al.*, 1992).

Allgemein wird angenommen, daß die Sekretion von Enzymen wie Proteinasen, Phospholipasen und N-Acetyl-Glukosaminidasen, oder auch von Siderophoren eine wichtige Rolle für die Virulenz von *C. albicans* spielt (Ibrahim *et al.*, 1995; Leidich *et al.*, 1998; Molloy *et al.*, 1994; Sweet und Douglas, 1991). Besonders gut untersucht sind die sauren Aspartatproteasen, die durch eine Familie von mindestens 10 Genen kodiert werden (*SAP 1-10*) (B. Hube, pers. Mitteilung). Stämme, in denen bestimmte *SAP*-Gene disruptiert sind, zeigen eine verminderte Virulenz (Hube *et al.*, 1997). Möglicherweise katalysieren die durch die *SAP*-Gene kodierten Proteasen bei einer Gewebeinvasion durch *C. albicans* im Wildtyp den Abbau von Wirtszellproteinen (Watts *et al.*, 1998).

Der erste Schritt zu einer Infektion ist jedoch der Kontakt zwischen Pilz und Wirtszelle. Die Adhäsion von *C. albicans* an Darmepithelien fördert somit nicht nur die gastrointestinale Be-

siedlung durch den Pilz, sondern stellt gleichzeitig die Voraussetzung für eine systemische Infektion dar, da *Candida* durch eine transepitheliale Migration in den Blutstrom gelangen kann (Pendrak und Klotz, 1995; Weide und Ernst, 1999). Die Adhäsion an Epithelzellen wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Hydrophobe Strukturen an der Zelloberfläche von *C. albicans* begünstigen die erste Interaktion mit der Wirtszelle (Cutler, 1991). Im Gegensatz zu dieser unspezifischen Wechselwirkung vermitteln Rezeptoren auf der *Candida*-Zellwand eine spezifische Erkennung von Bestandteilen der Wirtszelloberfläche. Diese sogenannten Adhäsine werden nach ihrem Mechanismus in drei Klassen unterteilt. Die erste Gruppe bilden mannosylierte Proteine, die die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp in der extrazellulären Matrix der Wirtszelle erkennen (Odds, 1994). Ein gut charakterisierter Vertreter dieser Gruppe ist Int1p, ein Integrin-ähnliches Protein, das an das humane Komplementfragment iC3b bindet (Gale *et al.*, 1996). *C. albicans* *int1*-Deletionsstämme weisen ein um 39% vermindertes Adhäsionsvermögen an humane Epithelzellen im Vergleich zum Wildtyp auf und sind im Mausmodell praktisch avirulent (Gale *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur ersten Gruppe erkennen Rezeptoren der zweiten Klasse nicht Peptidsequenzen, sondern Zucker. Neben Fukoseresten sind dies vor allem N-Acetylglukosamin sowie die AB0-Blutgruppenantigene (Brassart *et al.*, 1991; Douglas *et al.*, 1995; Cameron und Douglas, 1996). Die dritte Klasse von Adhäsinen bilden Mannoproteine, deren Zielrezeptoren in der Wirtszelle noch nicht charakterisiert sind. Allgemeines Prinzip der rezeptorvermittelten Adhäsion ist stets eine Wechselwirkung von glykosylierten *C. albicans*-Proteinen mit Oberflächenkomponenten der Wirtszelle. Daher zeigen Stämme mit O-Glykosylierungsdefekten ebenfalls eine eingeschränkte Adhäsion an humane Darmepithelzellen und sind im Modell einer systemischen Infektion der Maus avirulent, wie am Beispiel der Mannosyltransferase Pmt1p gezeigt werden konnte (Timpel *et al.*, 1998).

Von zentraler Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* ist auch die Fähigkeit, verschiedene Morphologien auszubilden (Abb. 1.1). Wie die Bäckerhefe *S. cerevisiae* bildet *C. albicans* kugelförmige Blastosporen, die sich durch Knospung vermehren. Nachdem die Tochterzelle eine gewisse Größe erreicht

hat, trennt sie sich von der Mutterzelle und kann nun ihrerseits knospen. Filamentöse Morphologien können auf verschiedene Weise ausgebildet werden. Trennen sich Mutter- und Tochterzelle nach der Knospung nicht, so daß sich eine Zellkette bildet, spricht man von Pseudohyphen. Meist elongieren die einzelnen Zellen einer Kette mehr oder weniger stark, so daß der filamentöse Charakter dieser Wachstumsform noch stärker ausgeprägt ist. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Zellmorphologien

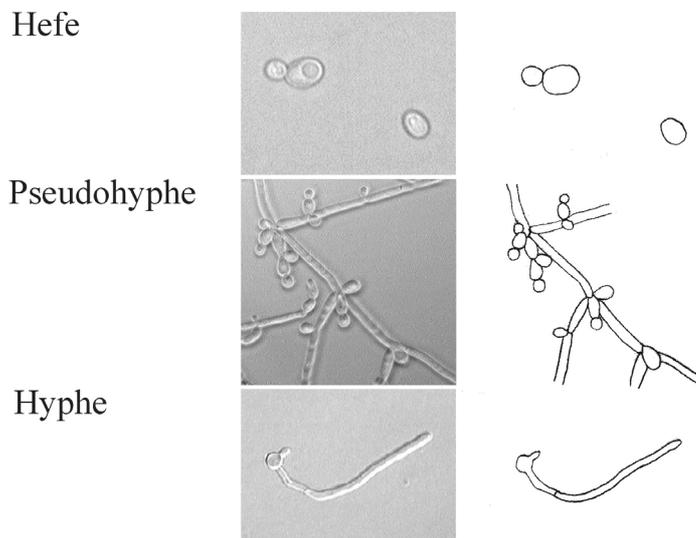


Abb. 1.1: Zellformen von *C. albicans*

entstehen echte Hyphen durch die Bildung eines Keimschlauches aus Blastosporen, wobei der apikal wachsende Tubus des Keimschlauches sekundär durch Septen unterteilt wird. Von den Hyphenabschnitten, die durch Poren verbunden sind, können erneut Blastosporen abgeknospt werden.

In vitro kann filamentöses Wachstum durch verschiedene Bedingungen induziert werden. Dazu zählen Medienzusätze wie Serum bzw. Serumkomponenten wie N-Acetylglukosamin und Prolin (Cassone *et al.*, 1985; Land *et al.*, 1975), aber auch die Erhöhung der Temperatur oder ein neutraler pH-Wert (Buffo *et al.*, 1984). Wie in *S. cerevisiae* kann auch Nährstoffmangel die Filamentbildung hervorrufen; so bildet *C. albicans* in Stickstoffmangelmedium (SLADH-Medium) oder in einem Medium mit komplexer Stickstoffquelle und Mannitol als Kohlenstoffquelle (Spider-Medium) Hyphen aus (Csank *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994). Schließlich konnte gezeigt werden, daß unter sauerstofflimitierenden Bedingungen ebenfalls filamentöses Wachstum induziert werden kann, z.B. durch Einbetten in Agar oder Auflegen eines Deckgläschens (Riggle *et al.*, 1999, Sonneborn, 1999). Obwohl bei vielen dieser Induktionsbedingungen Bezüge zu den Verhältnissen im Wirt naheliegen, ist immer noch unklar, welche Faktoren das filamentöse Wachstum *in vivo* auslösen.

Der Zusammenhang zwischen Dimorphismus und Pathogenität ist ebenfalls noch nicht restlos geklärt. Obwohl auch bei pathogenen Pilzen wie *Candida glabrata* und *Cryptococcus neoformans*, die lange als afilementös galten, inzwischen filamentöse Formen nachgewiesen werden konnten (Csank und Haynes, 2000; Wickes *et al.*, 1996), bleibt unklar, warum einerseits dimorphe Pilze wie *S. cerevisiae* apathogen sind, und andererseits rein filamentöse Gattungen wie *Aspergillus* sowohl apathogene als auch pathogene Vertreter beherbergen.

Zur Rolle des Dimorphismus' bei der Pathogenität von *C. albicans* wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. So geht man davon aus, daß Hyphen die Adhäsion an endo- und epitheliales Gewebe vermitteln und die Penetration in tieferliegende Zellschichten ermöglichen, während die Hefeform der schnellen Verbreitung mit dem Blutstrom dient (Cutler, 1991; Hostetter, 1994, Weide und Ernst, 1999). Phagozytierte Blastosporen können zudem durch die Ausbildung von Hyphen aus Makrophagen herauswachsen (Arai *et al.*, 1977; Vasquez-Torres und Balish, 1997).

Die Pathogenität von *C. albicans* muß als Zusammenspiel aller Virulenzfaktoren verstanden werden; gleichwohl scheint dem Dimorphismus eine zentrale Rolle zuzukommen. Nahezu alle Deletionen von Genen, die in die Regulation des filamentösen Wachstums involviert sind, haben auch eine Auswirkung auf die Virulenz im Mausmodell. Darüberhinaus werden einige andere Virulenzfaktoren hyphenspezifisch reguliert. Neben den bereits erwähnten sekretierten Aspartatproteasen sind dies vor allem Zellwandbestandteile. Für das ausschließlich in Hyphen gefundene Zellwandprotein Hwp1p wird beispielsweise eine Rolle bei der Adhäsion diskutiert. Hierbei wird angenommen, daß Hwp1p als Substrat einer Transglutaminase der Wirtszelle die kovalente Bindung von Wirtzellproteinen an die Oberfläche von *C. albicans* ermöglicht (Staab *et al.*, 1999). Die Funktion vieler anderer hyphenspezifisch exprimierten Proteine, wie Hyr1p und Ece1p, bleibt hingegen unklar, zumal bislang keine homologen Proteine identifiziert werden konnten, deren Aufgaben bekannt sind (Bailey *et al.*, 1996; Birse *et al.*, 1993).

Obwohl *C. albicans* taxonomisch zu den Deuteromyceten gezählt wird, besteht eine enge verwandtschaftliche Beziehung zu dem Ascomycet *S. cerevisiae* (Odds, 1988). Weil darüberhinaus auch Analogien in der Morphologie bestehen (auch die Bäckerhefe kann als einzellige Hefe und in Form von Pseudohyphen wachsen), wird die Regulation des Dimorphismus bei *S. cerevisiae* oft als Modell für die entsprechenden Prozesse bei *C. albicans* herangezogen. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß *S. cerevisiae* im Gegensatz zu *C. albicans* nicht in der Lage ist, echte Hyphen auszubilden. Stickstoffmangel induziert in haploiden Zellen invasives Wachstum, in diploiden hingegen die Bildung von Pseudohyphen (Roberts und Fink, 1994; Gimeno *et al.*, 1992). Die Umsetzung des Signals erfolgt dabei über mindestens zwei Signaltransduktionskaskaden, deren Bestandteile weitgehend charakterisiert werden konnten (Abb. 1.2).

Der erste Signaltransduktionsweg beinhaltet Komponenten einer Mitogen-aktivierten-Protein (MAP) Kinase-Kaskade, die auch die Antwort auf die Paarungspheromone verarbeitet (Liu *et al.*, 1993). Zentrales Element einer derartigen Kaskade ist ein Modul aus drei Kinasen, das durch sukzessive Phosphorylierung der jeweils folgenden Kinase das eingehende Signal weiterleitet und verstärkt. Im Falle der Pseudohyphenbildung sind dies die MAP-Kinase-Kinase (MAPKKK) Ste11p, die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) Ste7p und die MAP-Kinase (MAPK) Kss1p, die in unphosphoryliertem Zustand den Transkriptionsfaktor Ste12p inhibiert. Ste12p wird durch die Ste7p-vermittelte Phosphorylierung von Kss1 aktiviert und kann an spezifische Elemente in den Promotoren der zu regulierenden Gene binden.

Im Falle der Pheromonantwort sind dies die „pheromone responsive elements“ (PRE), während für invasives Wachstum und Pseudohyphenbildung „filamentous growth responsive elements“ (FRE) die Bindungsstelle für Ste12p darstellen. Lange Zeit war unklar, wie die Zelle die diversen Signale über gemeinsame Komponenten verarbeitet, so daß die für das jeweilige Signal benötigte Antwort (in Form einer Aktivierung der entsprechenden Gene) spezifisch erfolgen kann. Inzwischen weiß man, daß mehrere Kontrollmechanismen existieren, um die Spezifität eines Signalwegs zu gewährleisten. Ein wichtiger Faktor ist dabei die Heterodimerbildung von Ste12p, das gemeinsam mit Mcm1p die Gene der Paarungsantwort aktiviert, während eine Interaktion mit Tec1p die Pseudohyphenbildung reguliert.

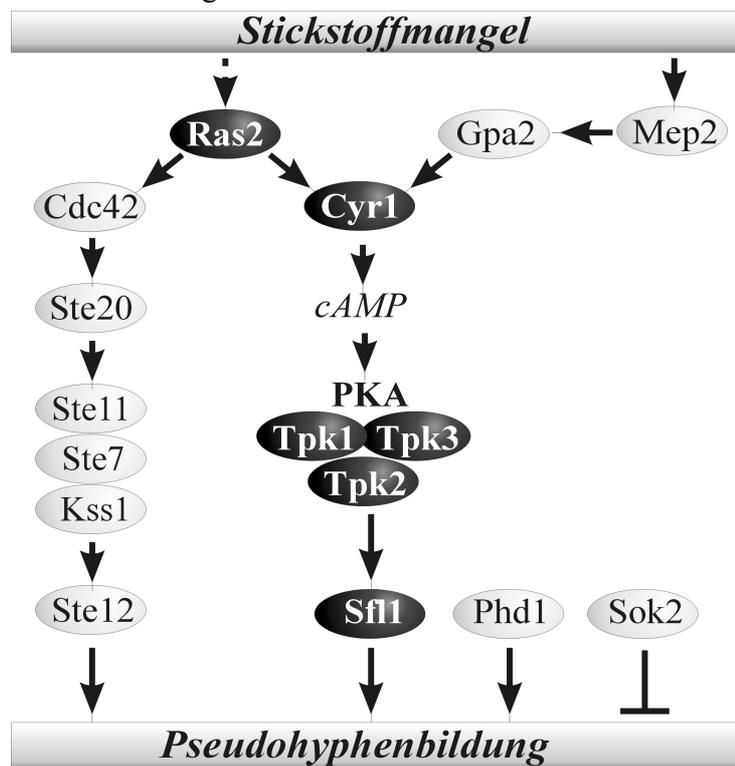


Abb. 1.2: Signaltransduktion der Pseudohyphenbildung bei *Saccharomyces cerevisiae*

Zusätzlich findet eine Regulation auf der Ebene der MAPK statt, die bei der Paarungstypantwort durch Fus3p ersetzt wird (Madhani und Fink, 1997).

Der zweite Signalweg, der invasives Wachstum und Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* steuert, beinhaltet eine Regulation über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Diese bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase A durch die Freisetzung der inhibierenden regulatorischen Untereinheit (Bcy1p) von der katalytischen Untereinheit. Zu dieser existieren in der Bäckerhefe drei Isoformen, Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p, die unterschiedliche Prozesse regulieren (Robertson und Fink, 1998). Es konnte gezeigt werden, daß die cAMP-abhängige Ausformung von Pseudohyphen von Tpk2p positiv reguliert wird, während Tpk3p einen inhibitorischen Effekt hat, wahrscheinlich durch Rückkopplungseffekte auf den cAMP-Spiegel (Pan und Heitman, 1999). Die Rolle von Tpk1p bei der Pseudohyphenbildung ist noch nicht endgültig geklärt. Sowohl Tpk1p als auch Tpk3p können in *tpk2*-Deletionsstämmen die Funktion der fehlenden Isoform übernehmen, wobei Stämme, in denen alle drei PKA-Isoformen deletiert wurden, nicht lebensfähig sind (Toda *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1998). Als mögliches Zielprotein von Tpk2p wird Sfl1p diskutiert, das als Transkriptionsfaktor das Flocculin Flo11p reguliert, ein für die Pseudohyphenbildung essentielles Zellwandprotein (Robertson und Fink, 1998; Lo und Dranginis, 1998).

Neben der Regulation des invasiven und filamentösen Wachstums werden auch andere zelluläre Mechanismen über die Proteinkinase A gesteuert, so z.B. die Antwort auf oxidativen, osmotischen oder hitzebedingten Streß (Charizanis *et al.*, 1999; Norbeck und Blomberg, 2000; Smith *et al.*, 1998;) Auch der Wechsel von fermentierbaren zu nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ist PKA-reguliert (Jiang *et al.*, 1998), ebenso wie der Abbau von Reservekohlehydraten oder die Eisenaufnahme (Robertson *et al.*, 2000). Die Kontrolle dieser Prozesse durch die Proteinkinase A ist sehr komplex und beschränkt sich nicht nur auf die Phosphorylierung von Zielproteinen. Vielmehr wird die PKA-Aktivität auch durch ihre Lokalisation gesteuert. Anders als in höheren Eukaryonten konnte für *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, daß die katalytische Untereinheit Tpk1p durch Bcy1p im Kern gehalten wird und erst nach erfolgter cAMP-Bindung durch Bcy1p ins Cytoplasma gelangt. Die Lokalisation von Bcy1p selbst wird dabei durch die Kohlenstoffquelle bestimmt (Griffioen *et al.*, 2000).

Ein Bindeglied zwischen dem MAPK-Weg und dem cAMP-abhängigen Weg bildet das kleine G-Protein Ras2, das sowohl über Cdc42p die MAPK-Kaskade aktiviert (Mösch *et al.*, 1996), als auch den cAMP-Spiegel über die Aktivierung der Adenylylzyklase Cyr1p reguliert. Ras2p war das erste Protein, das als Regulator der Pseudohyphenbildung beschrieben wurde (Gimeno *et al.*, 1992). Die dominant aktive Form Ras2^{Val19} stimuliert filamentöses Wachstum unabhängig von der Stickstoffkonzentration im Medium, wobei dieser Effekt durch eine Überexpression der cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterase Pde2p supprimiert werden kann (Ward *et al.*, 1995). Die Adenylylzyklase kann jedoch auch über ein trimeres G-Protein aktiviert werden, für dessen α -Untereinheit Gpa2p eine Beteiligung an der Kontrolle der Filamentbildung nachgewiesen werden konnte (Lorenz und Heitman, 1997). Die mit diesem G-Protein verbundenen Rezeptoren Gpr1p und Mep2p sind Transporter für Glukose bzw. Ammonium und stellen somit die Sensoren dar für die Bildung von Pseudohyphen verantwortlichen Signale dar (Lorenz *et al.*, 2000; Lorenz und Heitman, 1998).

Der Modellcharakter der Regulation der Pseudohyphenbildung bei *S. cerevisiae* für den Dimorphismus von *C. albicans* manifestiert sich unter anderem in der Existenz weitgehend homologer Komponenten der erwähnten Signaltransduktionswege. In den meisten Fällen konnten die *C. albicans*-Homologe durch Komplementation von *S. cerevisiae* Disruptionsstämmen oder über einen vergleichbaren Deletionsphänotyp identifiziert werden. Dennoch ergeben sich aus den unterschiedlichen Differenzierungsvorgängen beider Organismen Abweichungen, die zum Teil auch Gegenstand dieser Arbeit sind (Abb. 1.3).

Die Komponenten der MAPK-Kaskade, die bei *C. albicans* die Filamentbildung steuert, sind weitgehend charakterisiert und weisen hohe Homologien zu den entsprechenden Proteinen aus *S. cerevisiae* auf. Das MAPK-Modul besteht aus einer durch Datenbankvergleiche identifizierten, aber noch nicht näher beschriebenen MAPKKK, homolog zu Ste11p, der MAPKK Hst7p und der MAPK Cek1p (Liu *et al.*, 1993, Csank *et al.*, 1998). Als Zielprotein dieser Signalkaskade konnte der zu Ste12p homologe Transkriptionsfaktor Cph1p identifiziert werden. Deletionen von *CPHI* oder anderen Elementen der MAPK-Kaskade führen zu einem a filamentösen Phänotyp auf bestimmten Induktionsmedien, wobei dieser Defekt wenig ausgeprägt ist, wenn Serum als Induktor benutzt wird (Liu *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1997, Csank *et al.*, 1998). Bezüglich der Virulenz haben die einzelnen Komponenten dieses Weges unterschiedliche Effekte. Während eine *cek1*-Deletion im Mausmodell avirulent ist (Guhad *et al.*, 1998), hat eine *cst20*-Deletion eine geringere Auswirkung auf die Virulenz (Leberer *et al.*, 1996). Eine Disruption von *HST7* oder *CPHI* hat schließlich fast keinen Einfluß auf die Letalitätsrate im Mausmodell einer systemischen Infektion (Leberer *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997).

Wie in *S. cerevisiae* spielt auch in *C. albicans* das kleine G-Protein Ras eine Rolle bei der Regulation des filamentösen Wachstums. Dabei scheint es in *C. albicans* nur eine Isoform, Ras1p zu geben, deren dominant aktive Form das Hyphenwachstum stimuliert, während eine permanent inaktive Form es hemmt (Feng *et al.*, 1999). Über Ras1p findet eine Kontrolle des

cAMP abhängigen Signalweges statt, der in *C. albicans* einen zentralen Regulationsweg der Hyphenbildung darstellt. Mit der Erhöhung des cAMP-Spiegels ist (analog zu *S. cerevisiae*) eine Aktivierung der Proteinkinase A verbunden. Eine Isoform der PKA (Tpk2p) wurde bereits als Regulator des filamentösen Wachstums charakterisiert (Sonneborn, 1999).

Stämme, in denen *TPK2* überexprimiert wird, zeigen eine filamentöse Morphologie, während *tpk2*-Deletionsstämme eine verringerte Hyphenbildung aufweisen. Der Deletionsphänotyp ist dabei temperaturabhängig. Bei der üblichen Induktionstemperatur von 37°C ist die Hyphenbildung auf festen Medien kaum beeinträchtigt, wohingegen bei 30°C ein deutlicher Defekt in der Formation von Hyphen zu beobachten ist. Lediglich bei Induktion durch flüssiges Spider-Medium ist auch ein Defekt bei 37°C erkennbar (Sonneborn, 1999). Die Einordnung von Tpk2p in den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg zur Regulation filamentösen Wachstums erscheint auch aufgrund weiterer Anhaltspunkte berechtigt. Wie Rademacher *et al.* (1998) zeigen konnten, supprimiert die Überexpression des Gens für die Chaperonin-Untereinheit Cct8p aus *C. albicans* eine cAMP-abhängige Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* ebenso wie die Hyphenbildung in *C. albicans*. Ergänzend hierzu wies Sonneborn (1999) nach, daß auch die Tpk2p-induzierte Hyphenbildung in *C. albicans* durch eine Überexpression von *CCT8* gehemmt werden kann.

In dieser Arbeit wird eine weitere Isoform der PKA bei *C. albicans*, Tpk1p, vorgestellt und ihr Einfluß auf die Hyphenbildung erläutert. Ergänzende Untersuchungen zu Tpk2p sollen dabei die zentrale Bedeutung der Proteinkinase A für die morphogenetische Entwicklung von *C. albicans* herausstellen sowie die Einordnung der Tpk-Isoformen in ein Signaltransduktionsschema ermöglichen.

Über mögliche Zielproteine der Proteinkinase A in bezug auf die Morphogenese von *C. albicans* herrscht bislang noch keine endgültige Klarheit. In früheren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor Efg1p als mögliches Ziel der PKA in Frage kommt (Bockmühl, 1998). Efg1p gehört zu einer Klasse von Regulatoren der Morphogenese in Pilzen, die einen hochkonservierten Bereich, die sogenannte APSES-Domäne, aufweisen. Diese Domäne, deren Name sich aus den Anfangsbuchstaben der zuerst identifizierten Mitglieder zusammensetzt (Asm1p aus *Neurospora crassa*, Phd1p und Sok2p aus *S. cerevisiae*, Efg1p aus *C. albicans* sowie StuAp aus *Aspergillus nidulans*), ist zu ca. 80% unter den APSES-Proteinen konserviert und besteht aus einer basischen Helix-Loop-Helix- (bHLH-) Domäne, die von ebenfalls homologen Bereichen flankiert wird (Abb. 1.4). Asm1p wird in *N. crassa* für die Sporenbildung benötigt, StuAp vermittelt in *A. nidulans* die Differenzierung der Konidiphoren. Wie aus Abb. 1.2 ersichtlich, sind Phd1p und Sok2p bei *S. cerevisiae* in die Regulation der Morphogenese involviert. Die Überexpression von Phd1p stimuliert die Pseu-

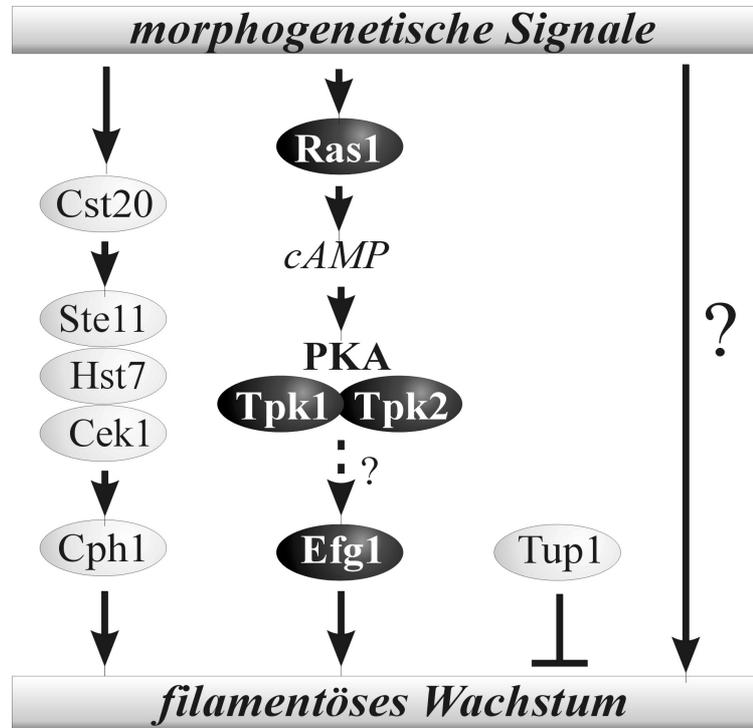


Abb. 1.3: Regulation filamentösen Wachstums bei *C. albicans*.

tausch zu Glutamat sogar einen hyperfilamentösen Phänotyp herbeiführt. Dieser Effekt ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß eine Phosphorylierung des T206 die Hyphenbildung steuert, so daß die nichtphosphorylierbare Form Efg-T206A die Hyphenbildung nicht unterstützt, wohingegen die Vortäuschung einer Phosphorylierung durch Efg-T206E ein permanent aktives Protein erzeugt. In dieser Arbeit werden weitere Ergebnisse vorgestellt, die nicht nur den Mechanismus einer Aktivierung von Efg1p durch die Proteinkinase unterstützen, sondern auch Hinweise geben, daß weitere Phosphorylierungen durch mindestens eine bisher unbekannte Kinase für die Funktion von Efg1p essentiell sind.

Über die Zielgene des Transkriptionsfaktors Efg1p ist bislang wenig bekannt. Zwar ist für einige Gene von Zellwandkomponenten, wie *HYR1*, *ALSI*, *ECE1* oder *HWPI*, eine Abhängigkeit ihrer Expression von *EFG1* nachgewiesen worden (Braun und Johnson, 2000); allerdings konnte noch in keinem Fall eine direkte Interaktion von Efg1p mit den Promotoren der möglichen Zielgene gezeigt werden.

Natürlich ist ein komplexer Vorgang wie die Steuerung filamentösen Wachstums von vielen Faktoren abhängig. Daher gibt es neben positiven Regulatoren wie Cph1p und Efg1p auch negativ regulatorische Proteine. Der wichtigste Inhibitor der Hyphenbildung bei *C. albicans* ist Tup1p, dessen Deletion einen hyperfilamentösen Phänotyp hervorruft (Braun und Johnson, 1997). In *S. cerevisiae* kommt dem antagonistischen Zusammenspiel der beiden zu Efg1p homologen bHLH-APSES-Proteine Phd1p und Sok2 ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Pseudohyphenbildung zu. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun mit Efh1p („*EFG* homolog 1“) ein zweites APSES-Protein aus *C. albicans* identifiziert werden, das möglicherweise als Efg1p-Antagonist eine ähnliche Konstellation in *C. albicans* herstellt, wie sie mit Sok2p und Phd1p in *S. cerevisiae* besteht.

Neben der Regulation der Hyphenbildung ist Efg1p auch in die Steuerung anderer morphogenetischer Prozesse involviert. So konnte für das bereits erwähnte Phänomen des „phenotypic switching“ eine Rolle für Efg1p in der Kontrolle des Wechsel von „white“ zu „opaque“ nachgewiesen werden (Sonneborn *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß das normale *EFG1*-Transkript nur in den ellipsoiden „white“-Zellen nachgewiesen werden kann (Srikantha *et al.*, 2000). Die „opaque“-Zellen zeigen hingegen eine stäbchenartige Zellform, wie sie auch für *efg1*-Deletionsstämme typisch ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Efg1p auch für die Bildung von Chlamydosporen erforderlich ist (Sonneborn, 1999). Chlamydosporen sind dickwandige, kugelförmige Zellen, die an pseudohyphalen Trägerzellen gebildet werden und für die Diagnostik von *C. albicans* von Bedeutung sind. Ihre zelluläre Funktion ist bislang nicht geklärt.

Die Tatsache, daß Efg1p für viele morphologische Differenzierungsprozesse essentiell ist, läßt es wichtig erscheinen, die Regulation dieses zentralen Transkriptionsfaktors besser zu verstehen. Mit dieser Arbeit konnte Efg1p als Bestandteil des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges in *C. albicans* etabliert werden. Zusätzlich wurde eine neue Isoform der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A, Tpk1p, charakterisiert und ihre Rolle für das filamentöse Wachstum aufgeklärt. Schließlich gelang es mit der Identifikation von *EFH1*, das Gen für ein weiteres APSES-Protein zu klonieren. Diese Ergebnisse vervollständigen das Modell eines PKA-Signaltransduktionsweges in *C. albicans* und helfen, das Bild der Regulation filamentösen Wachstums zu komplettieren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die benutzten 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), Pierce (Rockford), 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). Soweit nicht anders vermerkt wurden Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet. Radioisotope wurden von Amersham (Braunschweig) und NEN (Köln) erworben.

2.2 Stämme, Medien und Anzucht

2.2.1 Escherichia coli

Folgende *E.coli* Stämme wurden als Wirtstämme für rekombinante Plasmide benutzt:

DH5 α F^c: F^c[Φ 80 (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^qZ Δ M15 Tn10(Tet^r)]^c*

2.2.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*

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

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C, wobei festen Nährböden 1,5% Agar zugesetzt wurde. Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenz wurde dem Medium Ampicillin (100 μ g/ml) oder Kanamycin (50 μ g/ml) zugesetzt.

2.2.3 *C. albicans*

SC5314 prototroph (Fonzi und Irwin, 1993)

CAI4 Δ *ura3::imm434*/ Δ *ura3::imm434* (Fonzi und Irwin, 1993)

CAI8 *ade2::hisG/ade2::hisG* Δ *ura3::imm434*/ Δ *ura3::imm434*

(Fonzi und Irwin, 1993)

HLC67	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLC52	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLC74	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG (EFG1)</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
JKC18	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
JKC19	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG-URA3-hisG</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLC54	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i> (Lo <i>et al.</i> , 1997)
CDB1	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG efg1::hisG/efg1::hisG</i> (diese Arbeit)
CK43B-16L	wie CAI4, aber <i>cek1::hisG/cek1::hisG</i> (Csank <i>et al.</i> , 1998)
TPO7.4	wie CAI4, aber <i>Catpk2::hisG-URA3-hisG/Catpk2::hisG</i> (Sonneborn 1999)
AS1	wie CAI4, aber <i>Catpk2::hisG/Catpk2::hisG</i> (Sonneborn 1999)
IHB6	wie CAI4, aber <i>Catpk1::hisG/Catpk1::hisG-URA3-hisG</i> (M. Gerads, pers. Mitt.)
IHB6-4a	wie CAI4, aber <i>Catpk1::hisG/Catpk1::hisG</i> (M. Gerads, pers. Mitt.)
DB11.1.	wie CAI4, aber <i>Catpk2::hisG/Catpk2::hisG tpk1::hisG/TPK1</i>
M231	wie CAI4, aber <i>Catpk2::hisG/Catpk2::hisG tpk1::hisG/URA3-PCK1p-TPK1</i>
<i>ras1-2/ras1-4</i>	<i>ras1Δ::hisG/ras1Δ::hph</i> (Feng <i>et al.</i> , 1999)

2.2.4 *S. cerevisiae*

pJ69-4A	(Zwei-Hybrid-Stamm) <i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i> (James <i>et al.</i> , 1996)
XPY100a	wie pJ69-4a, aber <i>pde2::G418</i> (J. Heitman, pers. Mitteilung)

2.2.5 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium):	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose
SD (Minimalmedium):	0,67% Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (YNB ohne AS), 2% Glukose. Zur Anzucht auxotropher Hefen wurden die entsprechenden Aminosäuren nach Zimmermann (1975) supplementiert.
S4D:	0,67% YNB ohne AS, 4% Glukose
SCAA:	0,67% YNB ohne AS, 2% Casaminosäuren

Die Anzucht von Hefen erfolgte bei 30°C; zur Herstellung fester Medien wurde jeweils 1,5% Agar zugefügt.

2.2.6 Induktion von Hyphen bei *C. albicans*

Auf festen Medien (Serum oder „Spider“-Medium) wurden nach Vereinzelung der Zellen die Platten bei 37°C inkubiert und die Kolonieform über mehrere Tage beobachtet.

Für die Hypheninduktion in Flüssigmedien wurden unter Induktionsbedingungen über Nacht bis zu einer $OD_{600}=1$ angezogene Zellen nach Waschen in dest. H₂O in flüssiges Hypheninduktionsmedium mit einer $OD_{600}=0,1$ überführt. Bei der Hypheninduktion mit N-Acetylglukosamin (GlcNAc) wurden Zellen der logarithmischen Wachstumsphase in SB-Medium pH 5,5 gewaschen und ca. 10^7 Zellen in 1 ml SB-Medium (pH 5,5 in unter Zugabe von 10 mM Prolin wenigstens drei Stunden) bei 30°C gehungert. Zur Induktion der Hyphen wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (5 min, 3000 Upm), in vorgewärmtes SB-Medium, pH 6,5 überführt, so daß eine Zelldichte von 10^6 Zellen pro ml resultierte und unter Zusatz von 2,5 mM GlcNAc bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden je 10µl der Kulturen abgenommen und der Hyphenanteil an der Gesamtzellzahl nach Delbrück (1994) bestimmt.

Serum:	flüssig: H ₂ O oder YP (1% Hefeextrakt, 2% Pepton) mit 5% Pferdeserum, fest: zusätzlich 2% Agar
Spider-Medium:	flüssig: 1% Nutrient Broth, 1% Mannit, 0,2% K ₂ HPO ₄ , pH7,2; fest: zusätzlich 1,35% Agar (Liu <i>et al.</i> , 1994)
Salt-Base Medium (SB):	0,45% NaCl, 0,335% YNB ohne AS (Holmes und Shepherd, 1988)

2.2.7 Induktion von Chlamydosporen bei *C. albicans*

Die Induktion von Chlamydosporen erfolgte auf Maismehlagarplatten (Corn Meal Agar von Difco) mit 0,33% Tween-80 unter mikro-anaeroben Bedingungen (Casal und Linares, 1981; Joshi *et al.*, 1993). Hierzu wurden Teile von Vereinzelungsausstriche mit sterilen Deckgläsern abgedeckt, um mikroanaerobe Bedingungen zu erzeugen (Dalmau Inokulation). Die Platten wurden für fünf bis acht Tage bei Raumtemperatur inkubiert und die Chlamydosporenbildung mikroskopisch beobachtet.

2.2.8 Selektion Uridin-auxotropher Mutanten von *C. albicans*

Um Uridin-auxotrophe *C. albicans*-Stämme zu generieren (beispielsweise über eine *hisG*-vermittelte Exzision von *URA3*), wurde eine Flüssigkultur auf eine OD₆₀₀= 0,01 verdünnt und 10 bzw. 50 µl dieser Verdünnung auf FOA-Platten ausgestrichen. Die nach etwa einer Woche gewachsenen Kolonien wurden mittels einer Southern-Blot-Analyse auf den Verlust des *URA3*-Gens überprüft.

FOA-Medium: 0,02% FOA, 0,001% Uridin, 2% Glukose, 0,17% YNB ohne AS und (NH₄)₂SO₄, 0,1% Prolin (McCusker und Davis, 1991).

2.3 Verwendete Plasmide

2.3.1 Grundvektoren

pUC18	<i>E.coli</i> Klonierungsvektor (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUC19	<i>E.coli</i> Klonierungsvektor (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUK21	<i>E.coli</i> Klonierungsvektor (Viera und Messing, 1991)
pRC2312	<i>CaURA3</i> markierter <i>CaARS</i> Vektor (Cannon <i>et al.</i> , 1992)
pBT-4	<i>CaADE2</i> markierter <i>CaARS</i> Vektor (Tebarth, 1998)
pBI1	<i>PCK1p</i> in pRC2312 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pUC/C.TPK1	<i>CaTPK1</i> -ORF in pUC18 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pUC/TPK2	<i>CaTPK2</i> -ORF in pUC18 (Sonneborn, 1999)
pBI/TPK2	<i>PCK1p</i> - <i>CaTPK2</i> -Fusion in pRC2312 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pBI/HT	<i>PCK1p</i> - <i>CaTPK2</i> mit His-Tag in pRC2312 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pCaTPK2	<i>CaTPK2</i> unter eigenem Promotor in pRC2312 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pBI-HAHYD	<i>PCK1p</i> - <i>EFG1</i> -Fusion mit HA-Tag in pRC2312 (Sonneborn, 1999)
pAPEA	<i>PCK1p</i> - <i>EFG1</i> -Fusion mit HA-Tag in pBT4 (M. Gerads, pers. Mitteilung)
pDB1	pBI-HAHYD mit Aminosäureaustausch im <i>EFG1</i> : T206 zu A (Bockmühl, 1998)
pDB2	pBI-HAHYD mit Aminosäureaustausch im <i>EFG1</i> : T206 zu E (Bockmühl, 1998)
pCCa4	5,2 kb <i>CEK1</i> enthaltendes <i>XbaI</i> - <i>KpnI</i> -Fragment in <i>CaURA3</i> markiertem Vektor pVEC3 (Csank <i>et al.</i> , 1998)
pLJ19	<i>ADH1p</i> - <i>CPH1</i> in <i>CaURA3</i> markiertem Vektor YPB1- <i>ADH1p</i> (Csank <i>et al.</i> , 1998)
pGAD-C1-3	<i>ADH1p</i> -Gal4-Aktivierungsdomäne (3 Leseraster) in <i>LEU2</i> markiertem Vektor (James <i>et al.</i> , 1996)
pGBD-C1-3	<i>ADH1p</i> -Gal4-Bindedomäne (3 Leseraster) in <i>TRP1</i> markiertem Vektor (James <i>et al.</i> , 1996)
pRC-GFP3	<i>GFP3</i> in pRC18 (M. Dickmeis, pers. Mitteilung)
pQF145.2	<i>RASI</i> ^{V13} exprimierender Vektor (Feng <i>et al.</i> , 1999)

2.3.2 Vektorkonstruktionen (diese Arbeit)

2.3.2.1 Vorkonstruktionen

pDB26	<i>TPK1</i> -ORF (ohne ATG) in pUC18
pDB27	<i>PCKp-EFG1</i> (ohne Stop) in pUC18, amplifiziert mit Primern PCKp-HindIII und EFGend-HindIII auf pBI-HAHYD
pDB38	<i>PCKp-EFG1</i> -T206A (ohne Stop) in pUC18, amplifiziert mit Primern PCKp-HindIII und EFGend-HindIII auf pDB1
pDB39	<i>PCKp-EFG1</i> -T248A (ohne Stop) in pUC18, amplifiziert mit Primern PCKp-HindIII und EFGend-HindIII auf pDB7
pDB41	<i>PCKp-EFG1</i> -T248A (ohne Stop) in pUK21 (<i>HindIII</i>)
pDB42	<i>PCKp-EFG1</i> -T248A (ohne Stop) in pUK21 (<i>HindIII</i>)

2.3.2.2 *EFG1*-Mutationen

Ausgangsplasmid: pBI-HAHYD

pDB5	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -T208A durch Mutagenese mit Primern T208A1 und T208A2
pDB6	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -T208E durch Mutagenese mit Primern T208E1 und T208E2
pDB7	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -T248A durch Mutagenese mit Primern T248A1 und T248A2
pDB8	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -T248E durch Mutagenese mit Primern T248E1 und T248E2
pDB9	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -L241R durch Mutagenese mit Primern L241R1 und L241R2
pDB10	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -R262L durch Mutagenese mit Primern R262L1 und R262L2
pDB21	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -T207A durch Mutagenese mit Primern T207A1 und T207A2
pDB32	Aminosäureaustausch <i>EFG</i> -S258A durch Mutagenese mit Primern S258A1 und S258A2
pDB18	<i>EFG</i> -Stop188 (Stopkodon an Position 188 eingeführt durch Mutagenese mit Primern Stop188-1 und Stop188-2)
pDB19	<i>EFG</i> -Stop308 (Stopkodon an Position 308 eingeführt durch Mutagenese mit Primern Stop308-1 und Stop308-2)
pDB22	<i>EFG</i> -Stop420 (Stopkodon an Position 420 eingeführt durch Mutagenese mit Primern Stop420-1 und Stop420-2)

2.3.2.3 *GFP*-Fusionen

pDB28	pRC18- <i>PCK1p-EFG1</i> -GFP (<i>HindIII</i> -Fragment aus pDB27 in pRC-GFP3)
pDB44	pRC18- <i>PCK1p-EFG1</i> -T206A-GFP (<i>HindIII</i> -Fragment aus pDB42 in pRC-GFP3)
pDB45	pRC18- <i>PCK1p-EFG1</i> -T248A-GFP (<i>HindIII</i> -Fragment aus pDB41 in pRC-GFP3)

2.3.2.4 Vektoren für das „Zwei-Hybrid“-System

pDB14	pGAD-TPK2 [1,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II Fragment (<i>TPK2</i> -ORF) aus pUC/C.TPK2 in pGAD-C3]
pDB15	pGBD-TPK2 [1,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II Fragment (<i>TPK2</i> -ORF) aus pUC/C.TPK2 in pGBD-C3]
pDB16	pGAD-EFG1 [1,5 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI Fragment (<i>EFG1</i> -ORF) aus pUC19-EFG1 in pGAD-C2]
pDB17	pGBD-EFG1 [1,5 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI Fragment (<i>EFG1</i> -ORF) aus pUC19-EFG1 in pGBD-C2]
pDB23	pGAD-EFG-T206A (Aminosäureaustausch durch Mutagenese mit Primern EFG-T/A1 und EFG-T/A2 auf pDB16)
pDB24	pGBD-EFG-T206A (Aminosäureaustausch durch Mutagenese mit Primern EFG-T/A1 und EFG-T/A2 auf pDB17)
pDB25	pGBD-TPK1 [1,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II Fragment (<i>TPK1</i> -ORF ohne ATG) aus pDB26 in pGBD-C3]
pDB33	pGAD-EFH1 [2,1 kb <i>Bam</i> HI Fragment (<i>EFH1</i> -ORF) aus pDB30 in pGAD-C1]
pDB34	pGBD-EFH1 [2,1 kb <i>Bam</i> HI Fragment (<i>EFH1</i> -ORF) aus pDB30 in pGBD-C1]

2.3.2.5 *EFH1*-Vektoren

pDB30	pUC18-EFH1(ORF)
pDB35	pRC2312 mit <i>EFH1</i> unter PCK-Promotor

2.4 Synthetische Oligonukleotide (Primer):

M13 U-40	5'GTAAAACGAGGCCAGT-3'
EFG-T/A1	5'-CAGACCACGAGTCGCGACTACCATGTGG-3'
EFG-T/A2	5'-CCACATGGTAGTCGCGACTCGTGGTCTG-3'
EFG-T/E1	5'-CAGACCACGAGTCGAAACTACCATGTGG-3'
EFG-T/E2	5'-CCACATGGTAGTTTCGACTCGTGGTCTG-3'
T207A-1	5'-CAGACCACGAGTAACAGCTACCATGTGGGAAG-3'
T207A-2	5'-CCTCCCACATGGTAGCTGTTACTCGTGGTCTG-3'
T208A-1	5'-CGAGTAACAACCGCTATGTGGGAAGATG-3'
T208A-2	5'-CATCTTCCCACATAGCGGTTGTTACTCG-3'
T208E-1	5'-CGAGTAACAACGAGATGTGGGAAGATG-3'
T208E-2	5'-CATCTTCCCACATCTCAGTTGTTACTCG-3'
T248A-1	5'-CAATGTGGCCCAAATGGCACGTGGTAGAAGAG-3'
T248A-2	5'-CTCTTCTACCACGTGCCATTTGGGCCACATTG-3'
T248E-1	5'-CAATGTGGCCCAAATGGAACGTGGTAGAAGAG-3'
T248E-2	5'-CTCTTCTACCACGTTCATTTGGGCCACATTG-3'
L241R-1	5'-GATCAACGGAACCAAACGGCTCAATGTGGCCC-3'
L241R-2	5'-GGGCAACATTGAGCCGTTTGGTTCCGTTGATC-3'
R262L-1	5'-CAGAAAAGGTGTTACACGTTGTG-3'
R262L-2	5'-CACAACGTGTAACACCTTTTCTG-3'
S258A-1	5'-GGGATTTTGAAGCAGAAAAGGTGAG-3'
S258A-2	5'-CTCACCTTTTCTGCTTTCAAATCCC-3'
Stop188-1	5'-GATACGTTGAACGCCTAAAGCACTTCCACTGTGG-3'

Stop188-2	5'-CCACAGTGGGAAGTGCTTTAGGCGTTCAACGTATC-3'
Stop308-1	5'-GATATTAACGAGTGATTTAAACCGGAGTAACTCC-3'
Stop308-2	5'-GGAGTTACTCCGGTTTAAATCACTCGTTTAAATATC-3'
Stop420-1	5'-GCTCCTGGTAAGAACTAAAATACACCTGCATC-3'
Stop420-2	5'-GATGCAGGTGTATTTTAGTTCTTACCAGGAGC-3'
EFG2411	5'-CAACAAGCAGTACCTATC-3'
PCKp-HindIII	5'-AGAAGCTTGGCTGCAGGTGCAC-3'
EFGend-HindIII	5'-TTAAGCTTTTTTCTTCTTTGGCAACAGTGC-3'
AN1-BHI-ATG	5'-TTGGATCCATGAATGGTATTATGACG-3'
AN3-Stp-BHI	5'-TTGGATCCGTTTATCATAATGTTTTGTG-3'
EFH-FLP1	5'-TGGGTACCGGCCTGATTAGAATATGATTTCCG-3'
EFH-FLP2	5'-AACTCGACCGAGTGACAACTAATAGCAGA-3'
EFH-FLP3	5'-ATGCGGCCGCGGCCAATTTTCTTCAAATATTCTGG-3'
EFH-FLP4	5'-CAGAGCTCCTGGACCTTTCCTACCTGGATTCTC-3'

2.5 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Arbeiten nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.1 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). Für präparative Zwecke wurde die Plasmid-DNA über Säulen der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.5.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe

Die Isolation genomischer DNA aus *C. albicans* erfolgte in Anlehnung an die für *S. cerevisiae* entwickelte Methode (Sherman *et al.*, 1986). Hierzu wurden 5 ml stationäre Übernachtskultur abzentrifugiert, in Wasser gewaschen, in 400 µl SCE/Zymolyase-Lösung resuspendiert und 1h bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Sphäroplasten wurden für 5 min bei 3.000 Upm pelletiert und in 500 µl 50 mM EDTA pH 8,0 aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 50 µl 10% SDS-Lösung und 30 min Inkubation bei 65°C. Durch Zugabe von 100 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung wurden denaturierte Proteine auf Eis ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (15 min, 13.000 Upm, 4°C). Die DNA wurde mit 2 Volumina Ethanol (96%) unter Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, 4°C) ausgefällt, das Präzipitat in 400 µl RNase-Lösung resuspendiert und nach 1h bei 37°C durch Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt. Mit 2 Volumina Ethanol wurde die DNA dann erneut ausgefällt (30min, 13.000 Upm, 4°C), getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

SCE/Zymolyase-Lösung	1,2 M Sorbit, 0,1 M Natriumcitrat, 10 mM EDTA pH 7,0 200 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, 1 mM EDTA pH 8,0

2.5.3 Isolierung von RNA aus Hefe

Die Isolation der Gesamt-RNA einer 20 ml Hefekultur ($OD_{600} = 0,8 - 1,0$) erfolgte nach der Methode von Schmitt *et al.* (1990).

2.5.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die DNA- und RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm und 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989) oder durch Abschätzung auf einem Agarosegel bestimmt.

2.5.5 Restriktion von Nukleinsäuren

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Herstellerangaben (Roche, MBI Fermentas, New England Biolabs und Gibco BRL).

2.5.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mittels Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des „QIAquick-PCR-Purification“-Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.5.7 Molekulargewichts- und Größenstandards

Als DNA-Standard diente *EcoRI/HindIII* geschnittene λ -DNA (MBI Fermentas) (21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831 und 564 bp) oder *Hinfl* geschnittener Vektor pBR322 (1632, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 154 und 75 bp).

Als Protein-Standard wurde High Molecular Weight Marker (HMW, prestained) der Firma Sigma verwendet (27, 37, 49, 58, 84, 116 und 180 kDa).

2.5.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können durch spezifische Primer DNA-Fragmente gezielt amplifiziert werden. Die Reaktion erfolgte in einem 50 μ l (für Fragmente >5 kb) oder 100 μ l (für Fragmente <5 kb) Gesamtansatz unter Verwendung von 100 ng genomischer-DNA (bei der Amplifizierung von Vektor-DNA 20 ng) und 100 pmol der spezifischen Oligonukleotide in einem Thermocycler der Firma Biometra. Die $MgCl_2$ -Konzentration wurde zwischen 1,5 und 4 mM variiert. Nachdem die Denaturierungstemperatur erreicht worden war, wurde High-Fidelity-Polymerase-Mix' der Firma Roche zum Ansatz gegeben. Die Zyklenzahl und -dauer wurde dem GC-Gehalt der Primer und der Länge des gewünschten Produktes nach Empfehlungen des Herstellers angepaßt. Die verwendeten Primer sind unter 2.4 aufgeführt. Nach der Amplifikation erfolgte eine Aufreinigung der Fragmente mit dem „QIAquick PCR-Purification“-Kit der Firma Qiagen (Hilden).

2.5.9 Markierung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente wurden nach dem Prinzip des „random priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983) unter Verwendung des „DIG DNA Labeling and Detection Kit non-radioactive“ der Firma Roche (Mannheim) markiert. Die Markierung erfolgte nach Angaben des Herstellers..

Die für die RNA-Detektion eingesetzten α -³²P radioaktiv markierten DNA-Sonden (Feinberg und Vogelstein, 1983) wurden vor der Hybridisierung über eine Sephadex-G50-Säule aufgereinigt und im Szintillationszähler (Beckman, LS9000) gemessen.

Die Angabe der zur Markierung verwendeten Fragmente befindet sich im Ergebnisteil.

2.5.10 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über Southern Blot- Analyse

In Anlehnung an das Protokoll von Southern (1975), wurden jeweils 1,5-2 μ g DNA über Nacht mit dem gewünschten Restriktionsenzym geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Agarosegel zweimal für jeweils 15 min in Denaturierungslösung sowie zweimal für 5 min in Transferpuffer gewaschen. Die Übertragung auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) wurde mittels Kapillarblotverfahren durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Nach erfolgter Übertragung wurde die DNA durch zweistündige Trocknung bei 80°C auf der Membran fixiert. Die Detektion wurde mithilfe von polyklonalen Schaf-anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten nach der Vorschrift von Boehringer, Mannheim, „The DIG User's Guide for Filter Hybridization“ durchgeführt. Durch die an die Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase kann über den Umsatz von NBT (0,388 mg/ml) und X-Phosphat (0,175 mg/ml) die Lokalisation markierter Hybride auf der Membran bestimmt werden.

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Transferpuffer	1 M Ammoniumacetat

2.5.11 Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse

Zum Nachweis von RNA-Sequenzen wurden 10 μ g Gesamt-RNA auf einem denaturierendes Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarblotverfahren (Sambrook *et al.*, 1989) analog zur Southern-Blot-Analyse auf eine Nylonmembran übertragen. Nach einstündiger Prähybridisierung bei 42°C erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit der radioaktiv markierten spezifischen Sonde bei 42°C in Anwesenheit von deionisiertem Formamid. Nach Waschschritten mit sinkender Salzkonzentration und steigender Temperatur zur Erhöhung der Stringenz wurde die sondierte RNA autoradiographisch über einen Fuji-RX Röntgenfilm nachgewiesen. Die Exposition erfolgte bei -70°C unter Verwendung eines Expositionsverstärkers.

Prähybridisierungslösung	5x SSPE (900 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ HPO ₄ , 5 mM EDTA, pH 7,4) 50% deion. Formamid, 0,5% SDS, 50 μ g denat. Heringssperma-DNA, 5x Denhardts Reagenz (1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrolidon, 1% BSA)
Waschlösung I	2x SSPE, 0,1% SDS, 2x 10 min Raumtemperatur
Waschlösung II	1x SSPE, 0,1% SDS, 2x 10 min 50°C

2.6 Einführung von Punktmutationen in DNA-Sequenzen

Punktmutationen wurden mithilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Fa. Stratagene nach Angaben des Herstellers generiert.

Die verwendeten Oligonukleotide sind der Auflistung unter 2.4 zu entnehmen.

2.7 Transformation

E. coli-Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983) transformiert. Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetatmethode (Gietz und Woods, 1994). Die *C. albicans*-Transformation erfolgte nach der Sphäroplastenmethode von Sherman *et al.* (1986), modifiziert von Srikantha *et al.* (1995) oder nach der Elektroporationsmethode (DeBacker *et al.*, 1999).

2.8 Analyse von Proteinen

2.8.1 Antikörper

Die Analyse von Proteinen erfolgte mit Hilfe von den in Tabelle angegebenen Antikörpern. Die Verdünnungen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-P-Thr aus Kaninchen, polyklonal (Cellular Signalling)	Anti-Kaninchen Ig-AP (polyklonal, konjugiert an Alkalische Phosphatase)
Anti-Acetyl-Lysin aus Kaninchen, polyklonal (Upstate Biotechnology)	Anti-Kaninchen Ig-AP (polyklonal, konjugiert an Alkalische Phosphatase)
Anti-His aus Maus (Qiagen)	Anti-Maus Ig-POD (polyklonal, konjugiert an Peroxidase) (Boehringer)
Anti-HA High Affinity aus Ratte (Boehringer)	Anti-Ratte Ig-POD (polyklonal, konjugiert an Peroxidase) (Boehringer)
Anti-HA High Affinity aus Ratte (Boehringer)	Anti-Ratte IgG CY3 (polyklonal, gekoppelt an Fluorochrom Indocarbocyanin; Dianova)

2.8.2 Herstellung von Rohextrakten aus Hefekulturen

Für die Herstellung von Rohextrakten wurden 5 ml oder 20 ml Kultur der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (5 min 3.500 Upm, Raumtemperatur oder 3-10 min 10.000 Upm, 4°C bei Kulturen mit hohem Pseudohyphenanteil), einmal in Wasser gewaschen und bis zum Aufschluß bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluß wurden ein Volumen Glasperlen und drei Volumina Aufschlußpuffer auf das Pellet gegeben und für 10 min bei 4°C in einem V-brax (VX 2E, Janke & Kunkel) auf höchster Stufe gerüttelt. In einer anschließenden Zentrifugation (10 min, 13.000 Upm, 4°C) erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer und Glasperlen und der klare Überstand wurde als Rohextrakt weiterverwendet.

Aufschlußpuffer RE-Puffer: 50 mM HEPES-KOH, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 µg/ml Antipain, Pepstatin und Leupeptin, pH 7,5

2.8.3 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität

Die Aktivität von Reporter-gen-Konstrukten mit dem *lacZ*-Gen aus *E. coli*, die in der „Zwei-Hybrid“-Analyse verwendet wurden, erfolgte mittels einer Endpunktbestimmung. Hierfür wurden Doppelproben von je 1 ml einer Übernachtskultur ($OD_{600} = 0,5-1$) abzentrifugiert, mit 100 µl Lysispuffer versetzt und mindestens eine Stunde bei -70°C eingefroren. Den bei 30°C aufgetauten Proben wurde je 750 µl vorgewärmter Z-Puffer mit ONPG zugegeben. Sobald die Probe eine Gelbfärbung angenommen hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Zeit notiert. Nach Zentrifugation der Probe wurde die β -Galaktosidase-Aktivität nach folgender Formel bestimmt:

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

Lysis Puffer 0,1 M Tris/HCl, pH 7,6; 0,05% Triton X-100

Z-Puffer 16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,75 g KCl, 0,25 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
ad 1 l H_2O ; 1 mg/ml ONPG zugeben

2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des Proteinassays der Firma BioRad bestimmt. Als Grundlage wurde eine BSA-Eichkurve erstellt.

2.8.5 Immunopräzipitation

Eine Aufreinigung markierter Proteine aus den gewonnenen Rohextrakten erfolgte durch Immunpräzipitation. Hierfür wurde Protein G-Agarose verwendet. Protein A erkennt und bindet als Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus* die F_c -Anteile bestimmter Klassen von Immunglobulinen spezifisch. Gebunden an Agarose-Kugeln ermöglichen sie eine Affinitätsaufreinigung von Proteinen.

Nach dem Zellaufschluß wurde das Volumen der Rohextrakte auf 1,5 ml erhöht, und es folgte durch Zugabe von 50 µl Protein G-Agarose für wenigstens zwei Stunden bei 4°C unter Bewegung eine Fällung unspezifisch bindender Komponenten aus dem Rohextrakt. Nach der Abtrennung unspezifisch bindender Bestandteile des Rohextrakte durch Zentrifugation wurde der spezifische Antikörper zugegeben (0,5 µg/ml) und wenigstens 1 h unter Bewegung bei 4°C inkubiert. Die gebildeten Komplexe konnten dann durch Zugabe von Protein G-Agarose gebunden und nach einer Inkubation über Nacht (4°C , unter Bewegung) durch Zentrifugation (1 min, 13.000 Upm) gesammelt werden. Das Präzipitat wurde danach einmal mit „Hoch-Salz“-Puffer und einmal mit „Niedrig-Salz“-Puffer gewaschen (je 20 min, 4°C , unter Bewegung). Abschließend wurden die Proteine durch 5 min Inkubation bei 95°C in Auftragspuffer

(1x Laemmli) wieder vom Trägermaterial abgetrennt, und zur Analyse auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen.

Waschpuffer: „Hoch-Salz“: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl;
0,1 % Nonidet[®]P40; 0,05% Deoxycholat
„Niedrig-Salz“: wie „Hoch-Salz“, aber ohne NaCl

2.8.6 Koimmunopräzipitation (adaptiert nach Shulewitz *et al.*, 1999)

Analog zu 2.8.2 wurden aus zwei Stämmen, die entsprechenden Proteine überexprimieren, Rohextrakte gewonnen und die Proteinkonzentration auf 5 mg/ml eingestellt. Durch Zugabe von 40 µl Protein-G-Agarose zu 200µl Rohextrakt und anschließender Inkubation bei 4°C unter Bewegung für eine Stunde wurden unspezifisch an Protein-G bindende Bestandteile des Rohextraktes durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand zu 40µl neuer Protein-G-Agarose gegeben. Nach Hinzufügen von Antikörper (0,5 µg/ml) gegen das erste Protein wurde mindestens zwei Stunden unter Bewegung bei 4°C inkubiert, anschließend dreimal mit Rohextrakt-puffer gewaschen und schließlich in 30 µl SDS-Auftragspuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Durch Detektion mit dem Antikörper gegen das zweite Protein kann dann mittels Western-Blot-Analyse eine Bindung der beiden Proteine nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, daß der schnelle Umsatz von ATP eine Detektion der Interaktion verhindert, wurde entweder der chemische Crosslinker DTSP oder die nichtdissoziierbare Form von ATP, Adenosin 5'-O-(3-Thiophosphat) (ATP-γ-S) zugefügt.

2.8.7 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine über Western-Blot-Analyse

Zur Verwendung in einem Immunoblot wurden die Proteinrohextrakte im Verhältnis 1:3 mit 3x Laemmli-Puffer vermischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, Laemmli 1970) entsprechender Zusammensetzung (Sambrook *et al.*, 1989). Nach der Auftrennung im Gel wurden die Proteine in einer Tankblot-Kammer per Elektrobplot auf eine Immobilon P-Membran (Millipore, Eschborn) übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Der Nachweis der Proteine erfolgte nach Blockierung der Membran durch die sukzessive Zugabe spezifischer Primär- und Sekundäntikörper in geeigneten Konzentrationen für jeweils 90 min. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Die Detektion der Sekundäntikörper erfolgte über eine Farbreaktion durch NBT/X-Phosphat (siehe 2.5.10) oder über ein Chemilumineszenzverfahren (SuperSignal, Pierce), je nach verwendeter Zweitantikörperkopplung.

3x Laemmli-Puffer	188 mM Tris/HCL pH 6,8, 6% SDS, 30% Glycerin, 15% β-Mercaptoethanol, 0,006% Bromphenolblau
Transferpuffer	25 mM Tris/HCL pH 8,0, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Blockierungs-Lösung	1% Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim) in TBS
TBS	50 mmol/l Tris/HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,5
Wasch-Puffer (TBST)	TBS mit 0,1% Tween-20

2.8.8 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen

2.8.8.1 Nachweis über Phosphatase-Behandlung

Zum Nachweis von Phosphorylierungen wurden die überexprimierten Proteine zunächst immunopräzipitiert, vor der Inkubation bei 95°C allerdings mit 2 µl alkalischer Phosphatase (Roche) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Laufverhalten der dephosphorylierten Proteine wurde anschließend in einer Western-Blot-Analyse überprüft.

2.8.8.2 Nachweis durch Antikörper

Rohextrakte von Stämmen, die das entsprechende Protein überexprimieren, wurden im SDS-PA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Anti-Phospho-Threonin-Antikörpern (Cellular Signalling) nach Angaben des Herstellers behandelt.

2.8.9 *in vivo*-Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenz

Die N-terminale Markierung des Efg1p mit dem „HA-tag“ ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation des Proteins *in vivo*. Hierfür wurden Zellen der log-Phase durch die Zugabe von Formaldehyd (Endkonzentration 5%) über 3 h bei 30°C fixiert. Nach einmaligem Waschen in Puffer A wurden die Zellen in 1 ml Puffer A resuspendiert und durch Zugabe von 30 µl β-Glucuronidase (Sigma), 10 µl Zymolyase T100 (10 mg/ml, Seikagaku Kogyo Co. Ltd.) und DTT (10 mM Endkonzentration), wurden die Zellen für 20 min bei 30°C sphäroplastiert. Die Sphäroplasten wurden dann erneut in 1 ml Puffer A gewaschen und durch eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur in Puffer A, versetzt mit 0,1% Triton-X-100, permeabilisiert (modifiziert nach Pringle *et al.*, 1989). Für die Immunfluoreszenz wurden diese Zellen auf polylysinbeschichteten diagnostischen Objektträgern (Menzer Diagnostica) fixiert (20 µl Zellen pro Vertiefung). Nicht gebundene Zellen wurden anschließend durch Waschen mit PBS-Puffer wieder entfernt. Um ein Trocknen des Objekts zu verhindern, erfolgten die anschließenden Schritte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Inkubationen mit den aufeinander abgestimmten Antikörpern erfolgt jeweils 90 min. Durch mehrmaliges Waschen zwischen den Schritten mit PBS-Puffer mit 0,1% BSA (globulinfrei, Sigma) wurden unspezifisch gebundene Antikörper wieder entfernt. Zur Kontrolle wurde schließlich noch die DNA im Zellkern durch eine fünfminütige Zugabe von DAPI-Lösung angefärbt. Nach erneutem mehrmaligen Waschen wurde das Objekt dann mit Mounting-Medium überschichtet, mit einem Deckglas versehen und mit Nagellack versiegelt. Diese Präparate waren dann bei -20°C im Dunkeln dauerhaft lagerbar.

Puffer A	50 mM HEPES-KOH pH7,5, 1,2 M Sorbit, 10 mM NaN ₃
Polylysin	0,1% Poly-L-Lysin in H ₂ O
PBS-Puffer	8 mM Na-Phosphat pH 7,2, 140 mM NaCl, 3 mM KCL, 1,5 mM KH ₂ PO ₄
DAPI-Lösung	0,1% 4',6-Diamidino-2-phenylindol
Mounting-Medium	0,1% Phenylendiamin in PBS, 90% Glyzerin

Die Antikörperkombinationen und Verdünnungen finden sich im Ergebnisteil.

2.8.10 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durch „Zwei-Hybrid“-Experimente

Durch das „Zwei-Hybrid“-System können *in vivo* Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden. Dabei wird das eine Protein an eine spezifische DNA-Bindedomäne, das andere an eine Aktivierungsdomäne fusioniert. Im Falle einer Interaktion beider Partner wird durch die Bindung an den Promotor ein Reportergen transkribiert, dessen Aktivität auf die Interaktion rückschließen läßt. Das verwendete System (James et al., 1996) verwendet die Gal4p-Aktivierungs- und -Bindedomäne aus *S. cerevisiae*. Als Reportergene dienen genomische *GAL1p-HIS3*, *GAL2p-ADE2* und *GAL7p-lacZ* Konstruktionen, die im Falle von *HIS3* und *ADE2* Aminosäureprototrophie vermitteln, während mithilfe des *lacZ*-Gens die Interaktion über eine enzymatische Umsetzung von synthetischen Substraten der β -Galaktosidase gemessen werden kann (siehe 2.8.3).

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden Fusionsplasmide der potentiellen Partnerproteine an die Aktivierungs- bzw. Bindedomäne in den Stamm pJ69-4a transformiert und je vier unabhängige Transformanten auf synthetischen Minimalmedien, denen ein Aminosäurermix ohne den entsprechenden Auxotrophiemarker zugesetzt wurde, ausplattiert. Alternativ wurde eine Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt.

2.9 Aufnahmemessungen

2.9.1 Uridin-Aufnahme

Die Bestimmung der Aufnahme rate erfolgte nach einem Protokoll von Bisson und Fraenkel (1983) und wurde für Messung von ^{14}C -markiertem Uridin adaptiert.

25 ml einer Schüttelkultur ($\text{OD}_{600}=1$) wurden zweimal in Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml Citratpuffer resuspendiert. Nach der Bestimmung des Naßgewichtes (abzentrifugiertes Zellpellet) wurden pro 60 mg Zellen 1 ml Puffer hinzugegeben. 100 μl Aliquots wurden 5 min bei 30°C vorinkubiert, anschließend zu 50 μl Uridinlösung (75 μM ; 10 $\mu\text{Ci/ml}$) gegeben und 30 sek bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 100 μl der Uridin-Zellsuspension zu eiskalter Stopplösung wurde die Reaktion abgestoppt. Die Stopplösung wurde abgesaugt und der Filter (Whatman GF/C) viermal mit kalter Stopplösung gewaschen. Der Filter mit der Zellsuspension wurde in ein mit Szintillationslösung gefülltes Röhrchen gegeben und im Szintillationszähler (Beckman) das aufgenommene radioaktive Uridin nach folgender Formel bestimmt:

$$[\text{Uri}]_{\text{intrazell.}} = \frac{({}^{14}\text{C-Uri}_{\text{mess}} - {}^{14}\text{C-Uri}_{\text{B0}}) \cdot [\text{Uri}]_{\text{gesamt}} \cdot 100}{{}^{14}\text{C-Uri}_{\text{c0}} \cdot 10}$$

$$V \text{ [nmol/min/mg TG]} = \frac{[\text{Uri}]_{\text{intrazell.}} \cdot 60 \cdot 4}{t[\text{sek}] \cdot 4}$$

Zur Bestimmung des Blindwertes B0 wurden 67 µl Zellsuspension und 33 µl Uridinlösung direkt in die Stopplösung gegeben; die Gesamtradioaktivität c0 wurde bestimmt, indem 10 µl der Uridinlösung direkt in die Szintillationslösung gegeben wurden.

Citratpuffer: 100 mM Natriumcitrat, pH 5,6
Stopplösung: Citratpuffer mit 500 mM Uridin

2.9.2 Glukoseaufnahme

Die Messung und Berechnung der Glukoseaufnahme erfolgte analog zu 2.9.1, jedoch mit Kaliumphosphatpuffer statt Citratpuffer, 20 mM Glukose und nur 10 sek Meßzeit.

Kaliumphosphatpuffer: 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6,5
Stopplösung: Kaliumphosphatpuffer mit 2 M Glukose

2.10 Test auf Sensitivität gegen Chemikalien und Hitzeschock

Um festzustellen, ob bestimmte Chemikalien Auswirkungen auf unterschiedliche Stämme haben, wurden von Vorkulturen Verdünnungen mit einer Zelldichte von 10^6 , 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen/ml angefertigt. Diese Verdünnungen wurden dann mithilfe einer Auftropfhilfe („Frogger“) auf die entsprechende Antibiotikaplatte sowie auf eine Kontrollplatte (SD oder YPD) aufgebracht. Das Wachstum wurde nach zwei bis vier Tagen protokolliert und mit dem Wachstum auf der Kontrollplatte verglichen.

Um die Regenerationsfähigkeit nach Hitzeschock zu überprüfen, wurden Flüssigkulturen auf eine $\text{OD}_{600}=1$ verdünnt und ein Aliquot davon abgenommen. Vom Rest wurde 1 ml im Wasserbad bei 55°C für 20 min inkubiert und anschließend beide Aliquots auf YPD-Medium in den oben angegebenen Verdünnungen aufgetropft.

Die Sensitivität gegen oxidativen Streß wurde getestet, indem ein mit 30% H_2O_2 -Lösung getränktes Filterplättchen in die Mitte einer YPD-Agarplatte plaziert wurde und die zu testenden Stämme radial ausgestrichen wurden (nach Kreams *et al.*, 1995).

Zum Test auf Eisenaufnahme wurden die entsprechenden Stämme auf Medium mit den Chelatoren Ferrozin oder BPDS (Bathophenanthrolindisulfonsäure) angezogen (Endkonzentration je 0,5 mM) (nach Robertson *et al.*, 2000).

3 Ergebnisse

Da die Fähigkeit, zwischen einzelliger Hefeform und filamentösen Formen zu wechseln, als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. albicans* angesehen wird (Cutler, 1991), ist die Kenntnis der Regulation des dimorphen Wachstums von großer Bedeutung. Dabei werden als Antwort auf Umweltbedingungen Signaltransduktionskaskaden angeschaltet, die die Signale für die Hyphenbildung umsetzen und verstärken. Am Ende der Signalkaskaden stehen Transkriptionsfaktoren, die Zielgene aktivieren, welche beispielsweise für Proteine kodieren, die als Bausteine der Hyphenzellwand benötigt werden. Obwohl in *S. cerevisiae* die Induktion und Regulation der Pseudohyphenbildung recht gut untersucht ist, sind in dem Pathogen *C. albicans* viele Fragen offen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Komponenten von Signalwegen untersucht, die für die Regulation der Hyphenbildung von Bedeutung sind. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Charakterisierung einer neuen katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A, Tpk1p, im Hinblick auf ihre Funktion bei der Steuerung des filamentösen Wachstums. Thema des zweiten Teils dieser Arbeit ist die Regulation des für die Hyphenbildung essentiellen Transkriptionsfaktors Efg1p, u.a. durch die Proteinkinase A. Efg1p gehört zu einer Gruppe von Regulatoren der Morphogenese bei Pilzen, den sogenannten APSES-Proteinen. Mit Efh1p wird im dritten Teil dieser Arbeit ein neues Mitglied dieser Familie aus *C. albicans* vorgestellt.

3.1 Charakterisierung von Tpk1p aus *C. albicans*

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* scheint in *C. albicans* besonders die cAMP-abhängige Steuerung über die Proteinkinase A der zentrale Kontrollmechanismus der Hyphenbildung zu sein (Ernst, 2000). Die bekannten Komponenten der beiden Signaltransduktionswege sind zwischen beiden Arten relativ hoch konserviert, so daß die Verhältnisse in *S. cerevisiae* gut als Anhaltspunkt für die Mechanismen in *C. albicans* dienen können, auch wenn im einzelnen hinsichtlich der Art und Gewichtung der zu filamentösem Wachstum führenden Signalweiterleitung Unterschiede bestehen dürften.

Das Proteinkinase A-Holoenzym ist in *S. cerevisiae* ein Heterodimer aus zwei regulatorischen Untereinheiten, die von *BCY1* kodiert werden, sowie zwei katalytischen Untereinheiten. Für letztere sind drei Isoformen bekannt, die von den Genen *ScTPK1-3* kodiert werden. Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit bewirkt eine Loslösung von Bcy1p von der katalytischen Untereinheit und die damit verbundene Aktivierung der jeweiligen Tpk-Isoform. Jede Isoform reguliert spezifische zelluläre Prozesse, wobei ScTpk2p der Hauptregulator des filamentösen Wachstums ist (Robertson und Fink, 1998; Pan und Heitman, 1999). In *C. albicans* ist mit Tpk2p bislang eine Isoform der katalytischen Untereinheit der PKA bekannt (Sonneborn, 1999). Das *TPK1*-Gen aus *C. albicans* wurde von M. Gerads mithilfe eines aus dem *C. albicans*-Sequenzierprojekt bekannten Fragmentes über PCR amplifiziert und kloniert (pers. Mitteilung) und im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Der offene Leseraster von *CaTPK1* ist 1215 bp groß und kodiert für ein Protein von 405 AS. Innerhalb der Proteinsequenz existiert ein Motiv für die Bindung von ATP (Toda *et al.*, 1987) ab Position 101 in der Form Gly-X-Gly-X-X-Gly, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Im Abstand von 20 AS zum ersten Glycin befindet sich ein ebenfalls zu diesem Motiv gehöriges Lysin. Zusätzlich finden sich konservierte Regionen, die nach Knighton *et al.* (1991) für die Interaktion mit Zielproteinen benötigt werden (AS 205-211 bzw. 247-255).

3.1.1 Homologievergleich von CaTpk1p zu anderen Tpk-Isoformen aus *S. cerevisiae* und *C. albicans*

Um die Verwandtschaft zu anderen katalytischen Untereinheiten der PKA aus *C. albicans* und *S. cerevisiae* näher zu bestimmen, wurde mithilfe des Programmes Clustalx (Thompson *et al.*, 1997) ein Vergleich der Proteinsequenzen von ScTpk1-3p und CaTpk1-2p erstellt. Daraus ist ersichtlich, daß lediglich die C-terminalen Bereiche von ScTpk1-3 und CaTpk1-2 außerordentlich hoch konserviert sind (Abb. 3.1). Dies gilt sowohl für die Tpk-Isoformen einer Art als auch für einen Vergleich von *C. albicans* zu *S. cerevisiae*. Der N-Terminus hingegen weist keine signifikanten Homologien auf, wenn man von glutaminreichen Regionen bei den Tpk2-Proteinen beider Arten absieht. Vielmehr unterscheiden sich die N-Termini nicht allein durch ihre Aminosäureabfolge, sondern primär auch durch ihre Länge voneinander, die von 59 AS bei ScTpk2p über 76 bzw 77 AS bei ScTpk1p und ScTpk3p bis hin zu 81 bzw. 90 AS bei CaTpk1p und CaTpk2p reicht.

Die in Tabelle 3.1 dargestellten Homologievergleiche wurden sowohl aufgrund der kompletten Proteinsequenz berechnet, als auch bezogen auf den konservierten C-Terminus. Letztere Berechnung wurde gewählt, weil ein Homologievergleich von sehr wenig konservierten Sequenzen (wie dem N-Terminus der Tpk-Isoformen) eher als zufälliges Ergebnis einzustufen ist. Eine Aussage über tatsächliche Verwandtschaftsverhältnisse läßt sich daher mit derartigen Sequenzen kaum treffen.

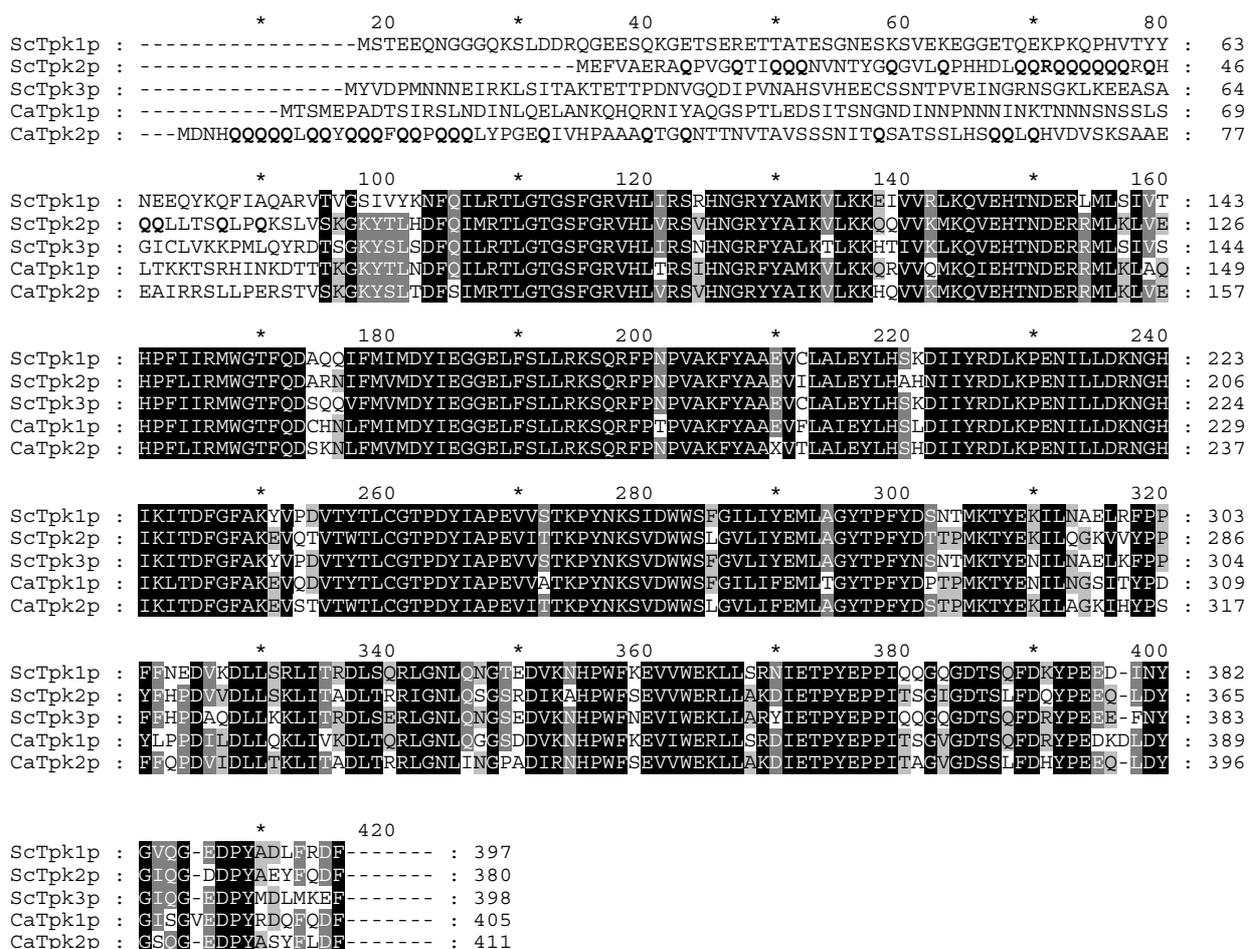


Abb. 3.1: Clustalx-Vergleich der Tpk-Isoformen aus *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Konservierte Bereiche sind dunkel dargestellt. Die glutaminreichen Regionen der Tpk2-Proteine sind durch Fettdruck hervorgehoben.

		Komplettes Protein					
		ScTpk1p	ScTpk2p	ScTpk3p	CaTpk1p	CaTpk2p	
ΔN	ScTpk1p		61	71	60	59	Tab. 3.1: Homologievergleich der Tpk-Isoformen aus <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i> . Rechts oberhalb der Diagonale finden sich die Homologien bezogen auf das Gesamtprotein, links unterhalb der Diagonale die Homologien bezogen auf den C-Terminus. Alle Angaben in % Identität.
	ScTpk2p	75		61	63	71	
	ScTpk3p	85	75		62	60	
	CaTpk1p	76	78	77		61	
	CaTpk2p	75	88	76	77		

Der Vergleich der C-terminalen Identitäten zeigt eine besonders nahe Verwandtschaft von Tpk2p aus *C. albicans* und *S. cerevisiae* mit 88% Identität sowie eine hohe Homologie zwischen ScTpk1p und ScTpk3p mit 85% Identität. CaTpk1p kann dabei keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden, da zu allen anderen Tpk-Isoformen Identitäten zwischen 75 und 77% errechnet wurden. Auch der Homologievergleich der kompletten Proteine führt im wesentlichen zum gleichen Ergebnis. Auch hier zeigen ScTpk1p und ScTpk3p sowie CaTpk2p und ScTpk2p mit jeweils 71% die größte Identität. Die Werte der restlichen Vergleiche schwanken in diesem Fall zwischen 59 und 63%.

Eine mithilfe des Programmes Blast (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführte Recherche ergab keine weitere Sequenzhomologie innerhalb des *C. albicans*-Genoms mit einer Identität dieser Größenordnung.

3.1.2 Überexpression von *TPK1*

Um zu überprüfen, ob ein erhöhter intrazellulärer Spiegel von Tpk1p eine Auswirkung auf die Zellmorphologie von *C. albicans* hat, wurde das Plasmid pBI/His-C.TPK1 im Stamm CAI4 exprimiert. In diesem Vektor steht *TPK1* unter der Kontrolle des induzierbaren *PCK1*-Promotors, der auf glukosehaltigem Medium reprimiert und auf anderen Kohlenstoffquellen dereprimiert ist. Durch Verwendung von flüssigem Medium mit 2% Casaminsäuren wurde eine Überexpression von *TPK1* erreicht, deren Auswirkungen in Abb. 3.2 zu sehen sind. Als

Vergleich diente die Überexpression des *TPK2*-überexprimierenden Plasmids pBI-TPK.

Obwohl die *TPK*-überexprimierenden Kulturen ein leicht eingeschränktes Wachstum aufwiesen, führte der erhöhte Spiegel von Tpk1p ebenso wie eine Überexpression von *TPK2*

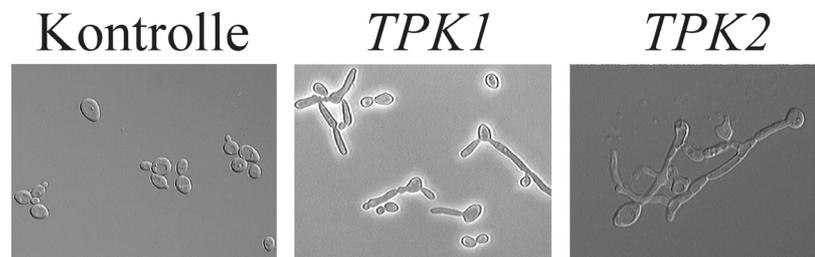


Abb. 3.2: Überexpression von *TPK1* und *TPK2*

zur Bildung von Filamenten, die aufgrund fehlender Einschnürungen als echte Hyphen anzusehen sind (Sonneborn, 1999). Als Kontrolle dienten Transformanten des Stammes CAI4 mit dem Vektor pRC2312, die unter den gewählten Bedingungen keinerlei filamentöses Wachstum aufwiesen. Aus diesen Daten ergibt sich ein erster Hinweis darauf, daß Tpk1p ebenso wie Tpk2p in die Regulation der Hyphenbildung involviert ist.

3.1.3 Northern-Blot Analyse der *tpk1*-Disruption

Die Disruption beider Allele eines Gens in *C. albicans* führt oft zu Phänotypen, die Aufschluß über die zelluläre Aufgabe des deletierten Gens geben. Sie ist daher ein wichtiger Schritt bei der Funktionsanalyse eines Gens. Für *TPK1* wurde diese Disruption von M. Gerads durchgeführt (pers. Mitteilung). Im Stamm CAI4 wurden dabei nach der von Fonzi und Irwin (1993) beschriebenen Methode beide Kopien des *TPK1*-Gens sequentiell disruptiert. Mittels Northern-Blot Analyse wurde anschließend überprüft, ob in dem so erhaltenen Stamm IHB6 auch

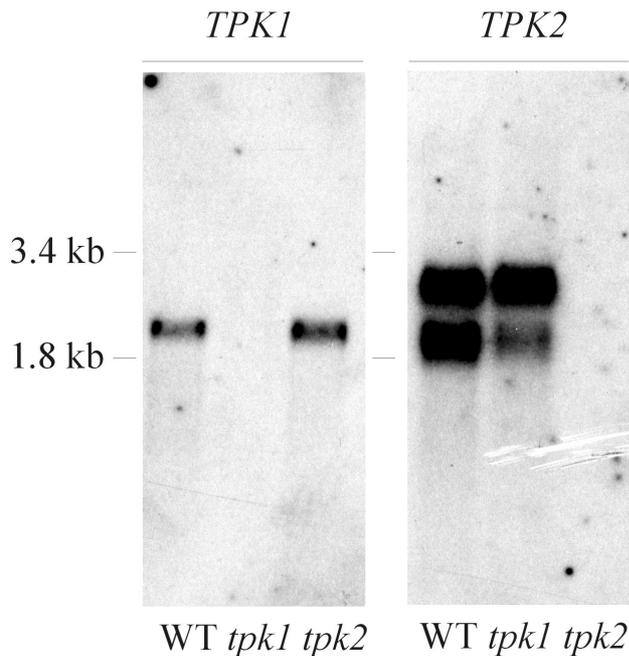


Abb. 3.3: Nachweis der Transkripte von *TPK1* und *TPK2* in verschiedenen Stämmen
 Linke Seite: Hybridisierung mit einem 755 bp-großen *PvuI/NdeI-TPK1*-Fragment aus pDB25. Rechte Seite: Hybridisierung mit einem 336 bp-großen *BamHI/XmnI-TPK2*-Fragment aus pDB14
 Aufgetragen wurde Gesamt-RNA aus den Stämmen SC5314 (WT), IHB6 (*tpk1*) und TPO7.4 (*tpk2*)

tatsächlich kein Transkript dieses Gens mehr feststellbar ist. Weiterhin sollte nachgewiesen werden, ob die Disruption von *TPK1* Auswirkungen auf die Stärke des *TPK2*-Transkriptes hat, und umgekehrt. Dies ist durchaus möglich, da das Fehlen eines Proteins (z.B. aufgrund der Disruption des kodierenden Gens) häufig durch ein homologes Protein kompensiert wird. Dies kann durch eine Aktivitätssteigerung auf Proteinebene, aber auch auf transkriptioneller Ebene geschehen. Dazu wurde die RNA der Stämme SC5314 (Wildtyp), IHB6 (*tpk1/tpk1*) und TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit DNA-Sonden aus dem 5'-Bereich von *TPK1* bzw. *TPK2* hybridisiert. Um zu gewährleisten, daß vergleichbare Mengen RNA zur Untersuchung kamen, wurde die RNA-Menge zuvor anhand der Menge an ribosomaler RNA abgeschätzt (Daten nicht gezeigt).

Wie aus Abb. 3.3 ersichtlich ist, konnte mit einer *TPK1*-Sonde ein ca. 2,0 kb großes Transkript in SC5314 und in TPO7.4 nachgewiesen werden. Dieses Transkript findet sich nicht in dem *tpk1/tpk1*-Stamm IHB6. Durch Hybridisierung mit einer *TPK2*-Sonde konnten jeweils zwei Transkripte mit einer ungefähren Größe von 2,0 kb und 2,8 kb in den Stämmen SC5314 und IHB6 nachgewiesen werden. Im *tpk2/tpk2*-Stamm TPO7.4 konnte keines der beiden Transkripte beobachtet werden.

Hinsichtlich der Stärke bestand für das mit der *TPK1*-Sonde detektierte Transkript kein Unterschied zwischen Wildtyp und *tpk2/tpk2*-Stamm. Die Hybridisierung mit der *TPK2*-Sonde ergab hingegen eine Abschwächung des kleinen Transkriptes im *tpk1/tpk1*-Stamm bei unverändertem Signal für das große Transkript. Somit stimuliert Tpk1p offenbar die Ausbildung des kleinen *TPK2*-Transkriptes.

3.1.4 Auswirkung der *tpk1*-Disruption auf die Hyphenbildung

Da die Überexpression von *TPK1* zu einem hyperfilamentösen Phänotyp führt, sollte im folgenden nachgeprüft werden, ob die Deletion dieses Gens in analoger Weise zu einem Defekt bei der Bildung von Hyphen führt. Dazu wurden Stämme, in denen eines oder beide Allele von *TPK1* disruptiert worden waren, auf festen Induktionsmedien ausgestrichen und ihre Hyphenbildung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet.

Wie aus Abb. 3.4 hervorgeht, hat die sequentielle Disruption beider *CaTPK1*-Kopien einen unterschiedlich starken Einfluß auf die Hyphenbildung bei verschiedenen Induktionsmedien. Auf Serum bewirkt bereits die Deletion einer Kopie eine drastische Abnahme der Hyphenformation, die durch die Deletion des zweiten Allels noch stärker ausgeprägt erscheint. Auch auf GlcNAc hat die sukzessive Disruption beider *TPK1*-Allele eine fortschreitende Verminderung der Hyphenbildung zur Folge. In beiden Fällen zeigt die Doppeldisruptante jedoch eine Restaktivität filamentösen Wachstums. Auf Spidermedium hingegen hat bereits die Deletion der ersten Kopie von *TPK1* einen völlig afilementösen Phänotyp zur Folge. Die Transformation eines Plasmids, in dem *TPK1* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors exprimiert wird, führte auf allen getesteten Medium zu einer vollständigen Rekonstitution des filamentösen Wachstums.

Diese Daten zeigen, daß die Expression des *TPK1*-Gens für die Bildung von Hyphen auf festen Medien benötigt wird, wobei der Anteil von *TPK1* an der Steuerung filamentösen Wachstum bei den getesteten Medien unterschiedlich hoch ist.

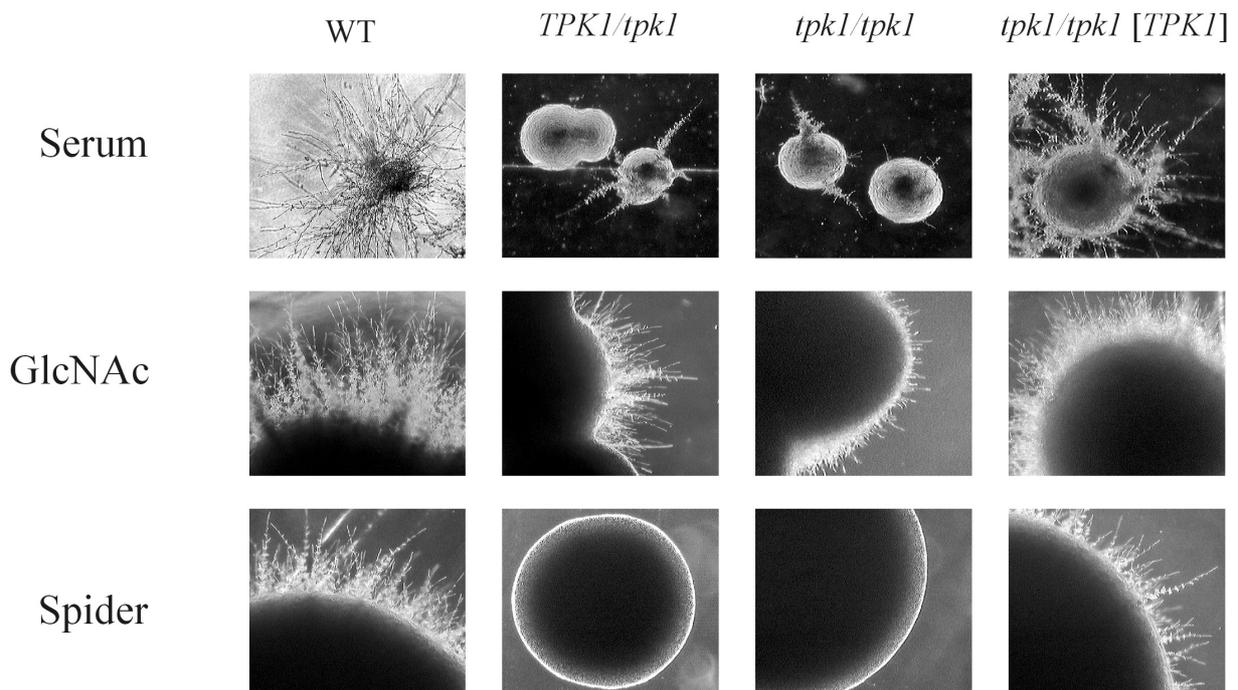


Abb. 3.4: Hyphenbildung von *tpk1*-Deletionsstämmen auf verschiedenen Induktionsmedien

Die getesteten Stämme SC5314 (WT), DB11 (*TPK1/tpk1*) und IHB6 (*tpk1/tpk1*) sowie der mit dem Plasmid pRC/CTG1 rekonstituierte Stamm IHB6-4a (*tpk1/tpk1* [*TPK1*]) wurden auf die angegebenen Induktionsmedien ausgestrichen und die Hyphenbildung nach drei Tagen protokolliert.

3.1.5 Auswirkung der *TPK*-Expression auf das Wachstum

Eine Deletion aller *TPK*-Gene in *S. cerevisiae* führt zu einem kompletten Wachstumsdefekt der Zelle. Dies konnte durch Untersuchungen an einem Stammkonstrukt nachgewiesen werden, in denen *ScTPK1* und *ScTPK3* deletiert wurden, und *ScTPK2* durch ein temperatursensitives Allel ersetzt wurde. Dieser Stamm ist bei der permissiven Temperatur lebensfähig, bei der restriktiven jedoch nicht. Dabei kann der letale Phänotyp von jedem der drei *TPK*-Gene komplementiert werden (Toda *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998).

Die Herstellung eines *C. albicans*-Stammes, in dem beide Allele von *TPK1* und *TPK2* deletiert sind, erwies sich als nicht durchführbar, da sowohl die Transformation des *TPK1*-Disruptionskonstruktes in den *tpk1/TPK1 tpk2/tpk2*-Stamm DB11.1 als auch die Transformation des *TPK2*-Disruptionsfragmentes in einen *tpk1/tpk1 tpk2/TPK2*-Stamm nicht zum Auftreten von transformierten Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Vor dem Hintergrund, daß in der *C. albicans*-Datenbank nur zwei *TPK*-Isoformen zu finden sind, und auch die Northern-Blot-Analyse keinen Hinweis auf ein drittes *TPK*-Transkript lieferte, erschien es wahrscheinlich, daß die Unmöglichkeit einer Transformation des Disruptionsfragmentes zur Erzeugung einer *tpk1/tpk1 tpk2/tpk2* Doppeldisruptante in *C. albicans* durch die fehlende Lebensfähigkeit eines derartigen Stammes in Analogie zu *S. cerevisiae* zu erklären ist.

Daher wurde eine alternative Methode gewählt, in der das verbleibende *TPK1*-Allel des Stammes DB11.1 durch ein Konstrukt ersetzt wurde, in dem *TPK1* unter der Kontrolle des induzierbaren *PCK1*-Promotors steht. Somit läßt sich durch Veränderung der Kohlenstoffquelle eine differenzierte Expression des letzten *TPK1*-Allels erreichen.

Mit dieser Methode gelang es in Zusammenarbeit mit M. Gerads, einen konditionalen *tpk*-Stamm zu konstruieren, in dem beide Allele von *TPK2* sowie ein Allel von *TPK1* disruptiert sind, und das letzte *TPK1*-Allel unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors exprimiert wird. Die Überprüfung der Disruptionen erfolgte durch M. Gerads über eine Southern-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt).

Wie Leuker *et al.* (1997) zeigen konnten, erlauben Medien mit YNB als Stickstoffquelle und verschiedenen Kohlenstoffquellen eine regulierte Expression des *PCK1*-Promotors. Dabei ist der *PCK1*-Promotor in Medien, die mindestens 2% Glukose enthalten stark reprimiert, während Medien mit 2% Casaminosäuren (CASA) eine starke Induktion des *PCK1*-Promotors vermitteln. Eine mittlere Induktion ist hingegen bei der Verwendung von Kohlenstoffquellen wie Saccharose oder Galaktose zu erzielen (C. Leuker, pers. Mitteilung).

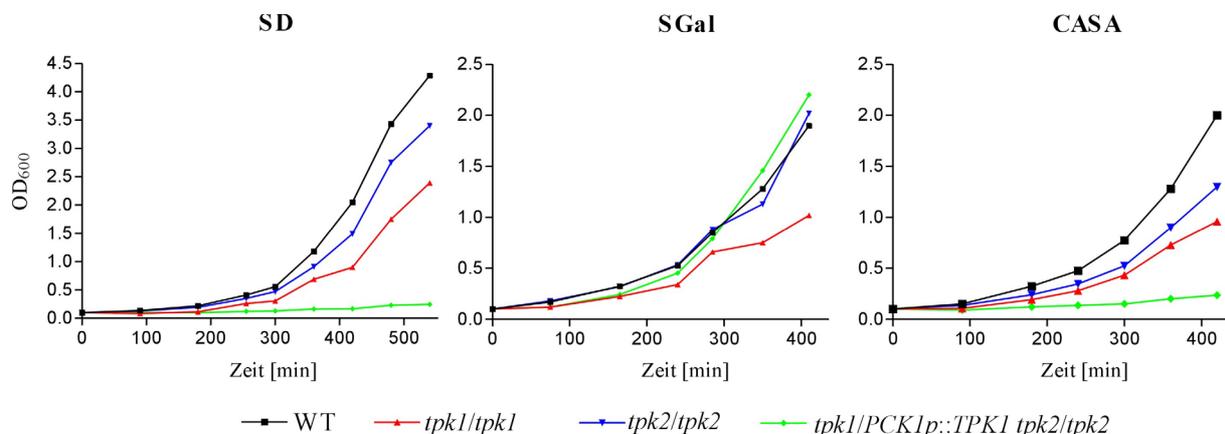


Abb. 3.5: Wachstum von *tpk*-Deletionsstämmen in Abhängigkeit von der Induktion des *PCK1*-Promotors
Das Wachstum der bei OD₆₀₀=0,1 inokulierten Zellen wurde für sieben Stunden in den angegebenen Medien über Messungen der optischen Dichte protokolliert. WT: Wildtypkontrolle (Stamm SC5314); *tpk1/tpk1*: Stamm I1HB6; *tpk2/tpk2*: Stamm TPO7.4 ; *tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*: Stamm M231
SD: YNB+2% Glukose; SGal: YNB+2% Galaktose; CASA: YNB+2% Casaminosäuren

Um die Auswirkungen des Transkriptspiegels des regulierten *TPK1*-Allels im Stamm M231 auf das Wachstum zu testen, wurden Zellen in flüssigen Medien angezogen, die entweder 2% Glukose, 2% Galaktose oder 2% Casaminosäuren als einzige Kohlenstoffquelle enthielten. Zum Vergleich wurden die Stämme SC5314 (WT), IIHB6 (*tpk1/tpk1*) und TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) mitgeführt. Alle Stämme wurden mit einer OD_{600} von 0,1 inokuliert und die zunehmende Zellzahl als Funktion der optischen Dichte über mehrere Stunden protokolliert.

Bei den in Abb. 3.5 gezeigten Wachstumskurven läßt sich erkennen, daß die Repression des *PCK1*-Promotors in glukosehaltigem Medium eine nahezu vollständigen Hemmung des Wachstums bei der konditionalen Doppeldisruptante M231 zur Folge hatte. Ebenso führte eine Überexpression des *TPK1*-Gens in Medium mit 2% Casaminosäuren zu einer Wachstumshemmung. Lediglich in Medium mit Galaktose als einziger Kohlenstoffquelle erlaubte die regulierte Expression des *PCK1*-Promotors ein Wachstum, das dem des *tpk2/tpk2*-Stammes oder des Wildtyps vergleichbar war.

Das Wachstum des *tpk2/tpk2*-Stammes war ebenfalls in geringem Maße von der verfügbaren Kohlenstoffquelle abhängig. Während in Medien mit Glukose und Casaminosäuren das Wachstum leicht hinter dem des Wildtyps zurückblieb, erreichte es in Medium mit Galaktose den gleichen Wert wie das des Wildtyps. Das Wachstum des *tpk1/tpk1*-Stammes zeigte keine Abhängigkeit vom Medium, wobei die Wachstumsrate deutlich geringer war als die des Wildtyps.

3.1.6 Vergleich der Hyphenbildung von *tpk*-Disruptionsstämmen auf festen Medien

Da auch für *C. albicans*-Stämme, in denen beide Allele von *TPK2* deletiert wurden, ein Defekt bei der Hyphenbildung beschrieben wurde (Sonneborn, 1999), sollte im folgenden der spezifische Einfluß von *TPK1* und *TPK2* bei der Bildung von Filamenten untersucht werden. Dazu wurden *tpk1*- und *tpk2*-Deletionsstämme sowie die konditionale *tpk1/tpk2*-Doppelmutante M231 auf festen Induktionsmedien ausgestrichen und ihre Hyphenbildung bei 37°C beobachtet (Abb. 3.6).

Erkennbar ist ein deutlicher Defekt der Hyphenbildung in der *tpk1*-Mutante IIHB6 auf Serum, während der *tpk2*-Deletionsstamm TPO7.4 eine nur schwach verminderte Filamentbildung

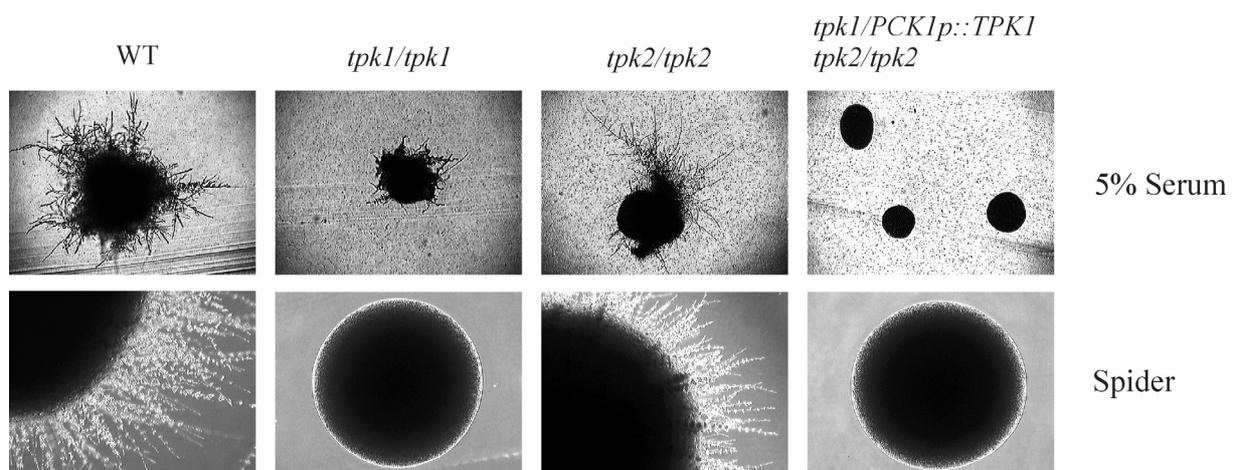


Abb. 3.6: Hyphenbildung von *tpk*-Disruptionsstämmen auf festen Medien

Die Stämme SC5314 (WT), IIHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) sowie die konditionale Doppelmutante M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) wurden auf festem Serum- oder Spidermedium ausgestrichen und die gebildeten Hyphen nach dreitägiger Inkubation bei 37°C fotografiert.

aufwies. Die konditionale Doppelmutante M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) bildete auf Serum überhaupt keine Hyphen mehr aus. Auf festem Spidermedium war bereits der Stamm IHB6 vollkommen afilamentös; dagegen ließ sich bei dem *tpk2*-Deletionsstamm TPO7.4 keine signifikante Verringerung der Hyphenbildung feststellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Tpk1p eine gewichtigere Rolle bei der Regulation der Hyphenbildung auf festen Medien zukommt als Tpk2p. Dies wird besonders auf Spidermedium deutlich, wo bei 37°C die Hyphenbildung durch eine *TPK2*-Disruption unbeeinträchtigt blieb, während die Disruption von *TPK1* zu einem völlig afilamentösen Phänotyp führte. Allerdings konnten bei *tpk1*-Disruptanten nach eintägigem Wachstum auf festen Induktionsmedien einzelne filamentöse Zellen beobachtet werden, die später von Hefezellen überwachsen wurden (nicht gezeigt).

3.1.7 Hyphenbildung in Flüssigmedien

Die Hypheninduktion auf festen Medien ist gut geeignet, um starke Defekte in der Hyphenbildung festzustellen. Hingegen ist es schwierig, quantitative Aussagen über die Fähigkeit zur Hypheninduktion zu treffen, da die Fähigkeit der einzelnen Kolonien, Hyphen auszubilden, stark variiert, und so kleine Unterschiede nicht differenzierbar sind. In Flüssigmedien läßt sich die Hypheninduktion jedoch quantifizieren, indem eine Kultur in Induktionsmedium überführt und der Anteil der Zellen bestimmt wird, die einen Keimschlauch ausgebildet haben. Bei einer Messung über mehrere Zeitpunkte erhält man so Induktionsprofile für die untersuchten Kulturen, die miteinander verglichen werden können. Dabei muß vor Beginn der Zählung festgelegt werden, welche Keimschlauchlänge als Hyphe betrachtet wird. Um eine noch bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde in einigen der durchgeführten Experimente die Hyphenbildung zu verschiedenen Zeitpunkten zusätzlich fotografisch festgehalten.

Zur Quantifizierung der Hyphenbildung bei *tpk*-Deletionsstämmen wurden die gleichen Stämme verwendet, die bereits zur Induktion auf festen Medien herangezogen wurden. Die über Nacht vorgezogenen Kulturen wurden nach einer Hungerphase in Wasser mit einer Enddichte von $OD_{600}=0,1$ in flüssiges Serum oder Spidermedium inokuliert. Die Auszählung des Hyphenanteils erfolgte in zwanzigminütigem Abstand, wobei ein Keimschlauch, dessen Länge mindestens Zeldurchmesser erreichte, als Hyphe gezählt wurde.

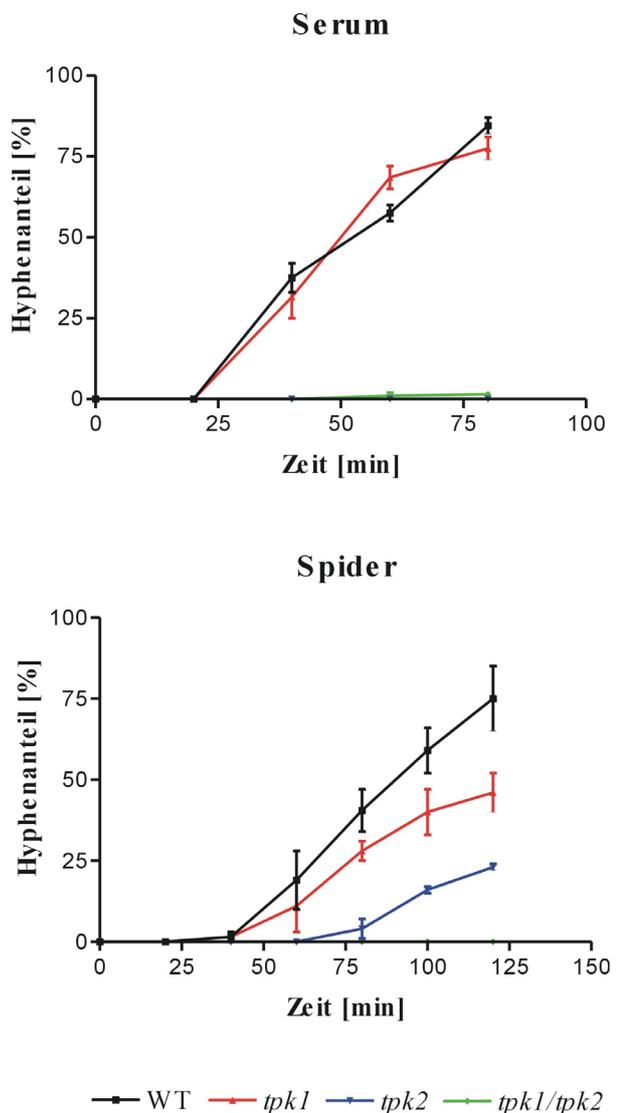


Abb. 3.7: Quantifizierung der Hyphenbildung in Flüssigmedien

Der Hyphenanteil der Kulturen SC5314 (WT), IHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) sowie die konditionale Doppelmutante M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) wurde bei 37°C zu den angegebenen Zeiten bestimmt.

Bei der Hypheninduktion durch Serum in Flüssigmedium zeigte der *tpk1*-Deletionsstamm IHB6 ein Induktionsprofil, das dem des Wildtyps vergleichbar ist. Die Geschwindigkeit der Hyphenbildung unterschied sich zu keiner Zeit signifikant von der des Wildtypstammes. Hingegen waren der *tpk2*-Deletionsstamm TPO7.4 und die konditionale Doppeldisruptante M231 nicht mehr in der Lage, in diesem Medium Hyphen zu bilden. In flüssigem Spidermedium war ebenfalls ein eindeutiger Defekt in der Hyphenbildung bei Stamm IHB6 (*tpk1*) erkennbar. Im Vergleich zum Wildtyp bildete dieser Stamm langsamer Hyphen aus. Stamm TPO7.4 war im Gegensatz zu Serum als Induktor in diesem Medium zur Filamentbildung fähig. Allerdings verlief diese noch langsamer als bei Stamm IHB6. Die konditionale Doppelmutante M231 wies wie in Serum einen völligen Defekt in der Bildung von Hyphen auf.

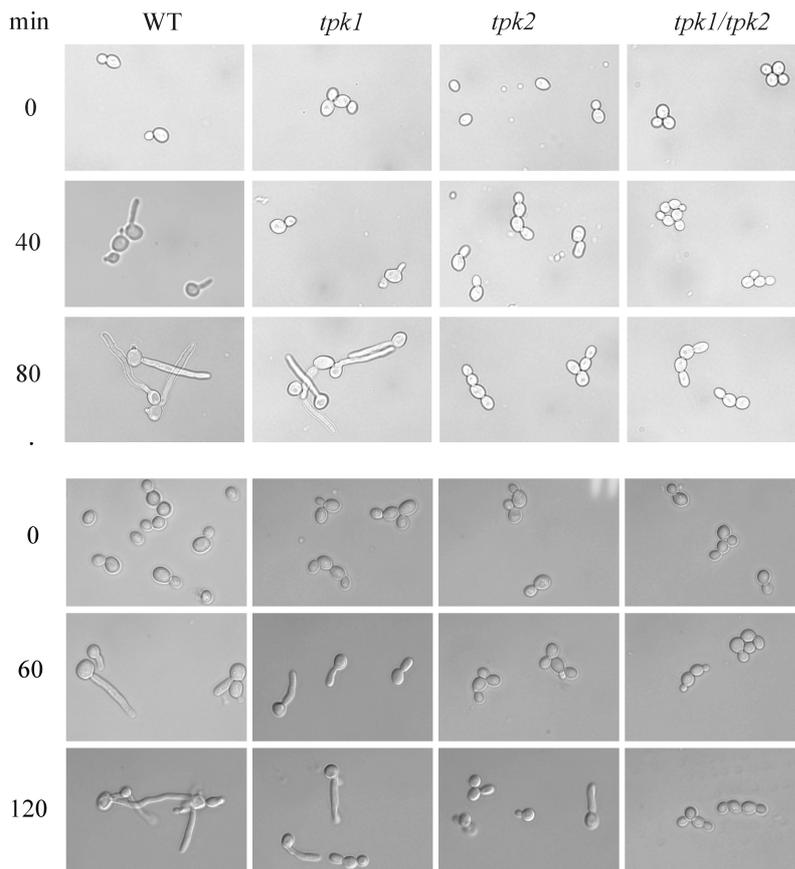


Abb. 3.8: Fotografische Dokumentation der Hyphenbildung in flüssigen Induktionsmedien.

Oben: Induktion durch 5% Pferdeserum Unten: Induktion durch Spidermedium

Die getesteten Stämme SC5314 (WT), IHB6 (*tpk1*), TPO7.4 (*tpk2*) und M231 (*tpk1/tpk2*) wurden über Nacht in YPD angezogen, abzentrifugiert und in Wasser auf $OD_{600}=1$ verdünnt. Anschließend wurden die Kulturen 1:10 in vorgewärmtes Induktionsmedium (YP+5%Serum oder Spidermedium) verdünnt und bei 37°C geschüttelt.

Der visuelle Vergleich der Hypheninduktion in flüssigen Serum- und Spidermedium in Abb. 3.8 bestätigt die in Abb. 3.7 gezeigten Daten. Hier fällt auch auf, daß die Länge der gebildeten Filamente zwischen den Stämmen teilweise stark differierte. Diesen Unterschied berücksichtigt die Auszählungsmethode nicht, da hier Keimschläuche mit einer Länge von mindestens Zelldurchmesser als Hyphe gezählt wurden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Deletion von *TPK1* keinen Effekt auf die Hyphenbildung in flüssigem Medium mit 5% Serum hat, während in flüssigem Spidermedium die Filamentbildung im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt ist. Eine Deletion von *TPK2* führt in flüssigem Serummedium zu einem völlig afilamentösen Phänotyp. In flüssigem Spidermedium ist ein *tpk2*-Deletionsstamm hingegen in geringem Maße in der Lage, Hyphen auszubilden. Eine Disruption beider *TPK*-Isoformen, bei der das letzte Allel von *TPK1* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors exprimiert wird, bleibt in allen getesteten Medien afilamentös.

3.1.8 Einfluß von *tpk*-Deletionen auf das invasive Wachstum

Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß das invasive Wachstum einiger haploider Stämme von ScTpk2p reguliert wird. Zellen von *ScTpk2*-Deletionsstämmen bewachsen den Agar nur oberflächlich und können mit Wasser abgewaschen werden (Robertson und Fink, 1998). Auch für *C. albicans* konnte nachgewiesen werden, daß die Überexpression von *TPK2* den Stamm CAI8 zu invasivem Wachstum befähigt (Sonneborn, 1999). Deshalb sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Deletion der *TPK*-Isoformen auf das invasive Wachstum von *C. albicans* hat. Hierzu wurden die Deletionsstämmen IIHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*), die konditionale Doppelmutante M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) und der Wildtypstamm SC5314 in hoher Verdünnung auf YPD-Platten ausgestrichen, so daß Einzelkolonien entstanden. Zur Kontrolle wurde mit den rekonstituierten Stämmen IIHB6-4a (*tpk1/tpk1 [TPK1]*) und AS1 (*tpk2/tpk2 [TPK2]*) ebenso verfahren. Nach drei Tagen wurde eine Kolonie fotografiert, mit Wasser abgewaschen und die im Agar verbliebenen Zellen nochmals fotografiert. Diese Methode erlaubt eine feinere Dokumentation des invasiven Phänotyps als die gebräuchlichere Methode, bei der ein dichter Ausstrich vor und nach dem Abwaschen der Zellen fotografiert wird, da bei dem verwendeten Verfahren die Morphologien der im Agar befindlichen Zellen erkennbar sind.

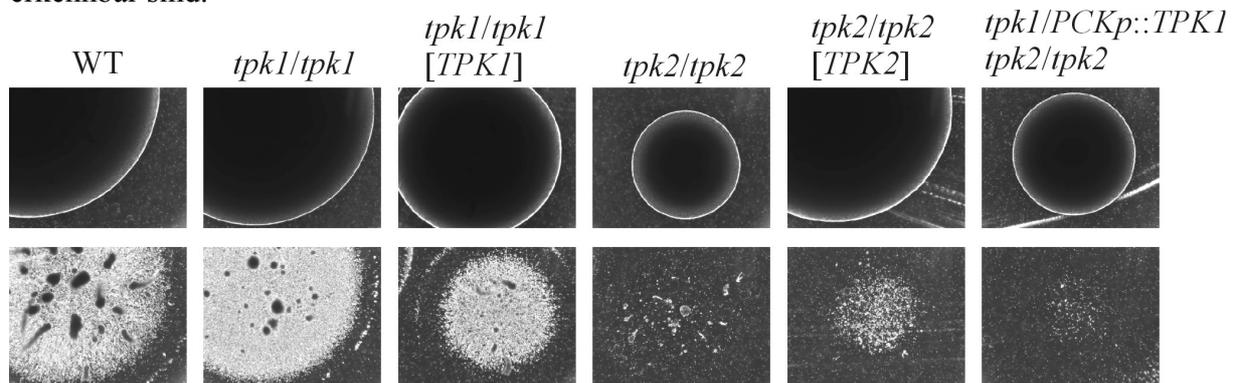


Abb. 3.9: Invasives Wachstum von *tpk*-Deletionsstämmen

Die als Einzelkolonien auf YPD-Medium angezogenen Zellen der Stämme SC5314 (WT), IIHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) und M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) sowie mit pRC-CTG1 transformierte Zellen des Stammes IIHB6-4a (*tpk1/tpk1 [TPK1]*) und mit pCaTPK2 transformierte Zellen des Stammes AS1 (*tpk2/tpk2 [TPK2]*) wurden nach dreitägiger Inkubation bei 30°C mit 32facher Vergrößerung vor (obere Reihe) und nach dem Abwaschen (untere Reihe) fotografiert.

Abb. 3.9 veranschaulicht, daß nach dem Waschen im gesamten Durchmesser der Kolonien des Wildtyps und des *tpk1*-Deletionsstammes IIHB6 im Agar verbliebene Zellen nachweisbar waren. Von den Kolonien des *tpk2*-Deletionsstammes TPO7.4 blieben hingegen nur sehr wenige Zellen im Agar zurück. Diese Anzahl ließ sich durch Rekonstitution mit einem *TPK2*-Vektor wieder heraufsetzen, auch wenn nicht die Invasionsrate des Wildtyps oder des Stammes IIHB6 erreicht wurde. Die Zellen der konditionalen Doppeldisruptante M231 wiesen nahezu keine invasive Aktivität mehr auf. Interessanterweise zeigten die wenigen im Agar befindlichen Zellen des Stammes TPO7.4 häufig einen filamentösen Phänotyp, der in Form der dunklen Stellen auch bei den Kolonien von SC5314 und IIHB6 zu erkennen war.

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß eine Deletion von *TPK2* eine drastische Verringerung des invasiven Wachstums auf YPD-Medium zur Folge hat, während eine Deletion von *TPK1* keinen Effekt auf die Invasivität ausübt.

3.1.9 Einfluß der Proteinkinase A auf die zelluläre Streßantwort

Ein gut untersuchter Regulationsmechanismus der Proteinkinase A in *S. cerevisiae* ist die Steuerung der zellulären Antwort auf schädliche Umwelteinflüsse. Diese beinhalten osmotische Veränderungen im Milieu der Zelle ebenso wie Hitzeschock, Hungerbedingungen oder den Kontakt der Zelle mit oxidierenden Agentien oder Strahlung. Die Verarbeitung dieser Signale erfolgt unter anderem über eine PKA-abhängige Inhibierung der Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p, die an sogenannte „stress responsive elements“ (STRE) in den Promotoren von streßinduzierten Genen binden und diese aktivieren (Marchler *et al.*, 1993; Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Eine Aktivierung der Proteinkinase A durch vorteilhafte Umwelt- und Wachstumsbedingungen bewirkt somit die Unterdrückung der zellulären Streßantwort von *S. cerevisiae*. Im folgenden sollte untersucht werden, ob auch in *C. albicans* eine niedrige PKA-Aktivität (durch Deletion der *TPK*-Gene) eine erhöhte Streßtoleranz bewirkt.

3.1.9.1 Osmotoleranz von *tpk*-Deletionsstämmen

Die Adaptation an osmotischen Streß erfolgt bei *S. cerevisiae* über den HOG-Signalweg (Posas *et al.*, 1996), einer MAPK-Kaskade, die über die Aktivierung von STRE die für die Osmotoleranz benötigten Gene anschaltet (Schüller *et al.*, 1994). Durch Überexpression der MAPKK *PBS2* kann der Streß-sensitive Phänotyp von Mutanten mit konstitutiv aktivem PKA-Signalweg unterdrückt werden (Boguslawski, 1992).

Durch Experimente mit *tpk*-Deletionsstämmen von *C. albicans* sollte überprüft werden, ob

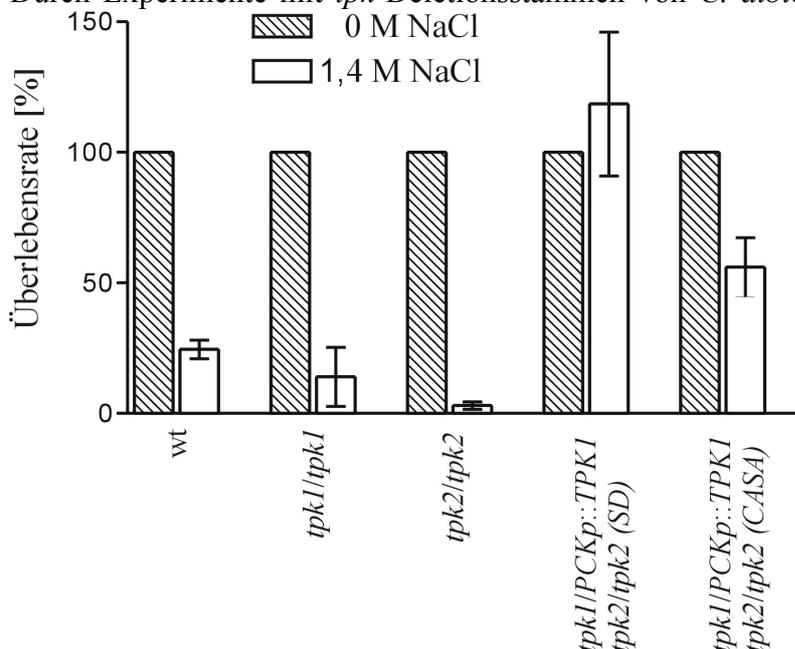


Abb. 3.10: Osmotoleranz von *tpk*-Deletionsstämmen

Je zwei SD (Reihen 1-4) bzw. CASA (Reihe 5) Übernachtskulturen der Stämme SC5314 (WT), IIHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) und M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) wurden verdünnt und je 100 Zellen auf YPD-Medium mit 0 M NaCl (schraffierte Balken) und 1,4 M NaCl (weiße Balken) ausgestrichen. Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C wurden die gebildeten Kolonien gezählt, wobei die Koloniezahl auf Medium mit 0 M NaCl jeweils gleich 100% gesetzt wurde.

diese Stämme – analog zu den Verhältnissen in *S. cerevisiae* – eine Erhöhung der Osmotoleranz vermitteln. Dazu wurden SD-Übernachtskulturen der Stämme SC5314 (WT), IIHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) und M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) auf eine $OD_{600}=1$ verdünnt und je 100 Zellen eines Stammes auf YPD-Platten mit einer NaCl-Konzentration von 0 M und 1,4 M ausplattiert. Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt und durch Vergleich der koloniebildenden Einheiten auf niedrig- (0 M NaCl) und hochosmolarem (1,4 M NaCl) Medium die Überlebensrate bestimmt. Dabei wurde die Anzahl an Kolonien auf den niedrigosmolaren Agarplatten gleich 100% gesetzt. Um den Einfluß des konditional exprimierten *TPK1*-Allels zu bestimmen, wurde eine Kultur

des Stammes M231 zur Induktion des *PCK1*-Promotors zusätzlich über Nacht in Minimalmedium mit 2% Casaminsäuren angezogen.

Wie aus Abb. 3.10 deutlich wird, hatten *tpk1*- und *tpk2*-Nullmutanten ebenso wie der Wildtyp auf hochosmolarem Medium eine deutlich verringerte Überlebensrate. Nur etwa 5-25% der ausplattierten Zellen überlebten den osmotischen Schock. Die konditionale Doppelmutante M231 zeigte hingegen keinen Unterschied bei der Überlebensrate zwischen Medium mit 0 M NaCl und Medium mit 1,4 M NaCl, wenn das regulierbare *TPK1*-Allel durch Vorinkubation in glukosehaltigem Medium reprimiert wurde. Durch eine Vorinkubation unter induzierenden Bedingungen ließ sich die Überlebensrate dieses Stammes wieder auf etwa 60% im Vergleich zu niedrigosmolarem Medium senken. Das entspricht allerdings immer noch einer zwei- bis dreifachen Erhöhung der Osmotoleranz im Vergleich zum Wildtyp. Der Durchmesser der gebildeten Kolonien war bei Stamm M231 aufgrund des allgemeinen Wachstumsdefektes auf allen Medien kleiner als der der anderen getesteten Stämme (vgl. 3.1.5).

Während die Deletion einer *TPK*-Isoform keinen Einfluß auf die Osmotoleranz ausübte, konnte durch die Verwendung der konditionalen *tpk*-Doppeldisruptante M231 unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingungen eine Überlebensrate auf hochosmolarem Medium erreicht werden, die derjenigen auf niedrigosmolarem Medium entsprach. Dieser Phänotyp konnte durch vorherige Induktion des *PCK1*-Promotors teilweise unterdrückt werden.

3.1.9.2 Einfluß von *tpk*-Deletionen auf die Thermotoleranz von *C. albicans*

Die Hitzeschockantwort stellt eine weitere zelluläre Verarbeitung von Streßbedingungen dar, für die in *S. cerevisiae* ein Einfluß der Proteinkinase A nachgewiesen werden konnte (Toda *et al.*, 1988). Zur Überprüfung der Verhältnisse in *C. albicans* wurden Verdünnungen von Flüssigkulturen der *tpk*-Deletionsstämmen IHB6 (*tpk1/tpk1*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) und M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*) sowie des Wildtypstammes SC5314 für 20 min einer Temperatur von 55°C ausgesetzt und anschließend auf YPD-Platten getropft. Zur Kontrolle wurden Aliquots der verdünnten Kulturen vor dem Hitzeschock abgenommen und ebenfalls auf YPD-Platten getropft. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 3.11 dargestellt.

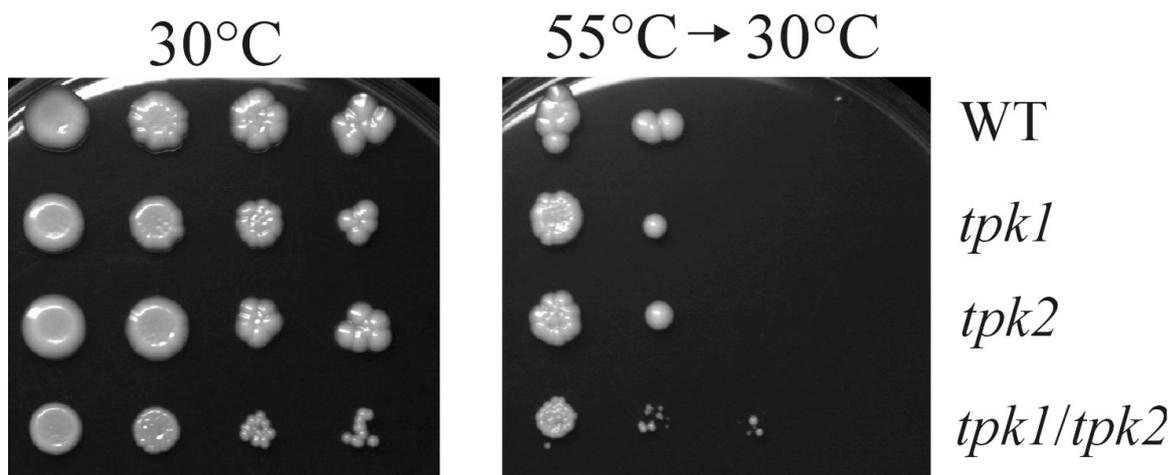


Abb. 3.11: Hitzeschocksensitivität von *tpk*-Deletionsstämmen

YPD-Übernachtskulturen der Stämme SC5314 (WT, obere Reihe), IHB6 (*tpk1/tpk1*, zweite Reihe), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*, dritte Reihe) und M231 (*tpk1/PCK1p::TPK1 tpk2/tpk2*, untere Reihe) wurden auf eine OD_{600} von 2 eingestellt und Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} angefertigt. Ein Aliquot dieser Verdünnungen wurde abgenommen; der Rest für 20 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde von jeder Verdünnung 10 µl auf YPD-Platten aufgetropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Links: Verdünnungsreihe ohne Hitzeschock (von links nach rechts: unverdünnt, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6})

Rechts: Verdünnungsreihe nach Hitzeschock (gleiches Auftragsschema wie links)

Nach dem Hitzeschock zeigten die Stämme SC5314, IIHB6 und TPO7.4 eine stark verminderte Überlebensrate. Bereits bei einer Verdünnung von 10^{-2} waren nur noch vereinzelte koloniebildende Zellen zu erkennen. Die konditionale Doppeldisruptante M231 zeigte auch bei einer Verdünnung von 10^{-4} noch koloniebildende Zellen. Die Kolonien waren zwar im Vergleich zu den anderen Stämmen sehr klein, was jedoch auf ein allgemeines Wachstumsdefizit zurückzuführen sein dürfte, denn auch ohne Hitzebehandlung blieb der Koloniedurchmesser des Stammes M231 hinter dem der anderen Stämme zurück.

Wie bei dem vorhergehenden Versuch zur Osmotoleranz müssen zur Erhöhung der Thermotoleranz beide *TPK*-Isoformen ausgeschaltet sein. Die Deletion von *TPK1* oder *TPK2* allein reicht nicht aus, um die Hitzeschocksensitivität herabzusetzen.

Andere Effekte, die bei *S. cerevisiae* in Zusammenhang mit der PKA-Aktivität stehen, konnten in *C. albicans* nicht nachgewiesen werden. So zeigten *tpk*-Deletionsstämme in *C. albicans* weder eine höhere Toleranz gegenüber H_2O_2 noch ein besseres Wachstum auf Medium mit nichtvergärbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol, Glyzerin). Ebenso war kein besseres Wachstum auf Medium zu beobachten, dem Eisenchelatoren zugegeben wurden (Daten nicht gezeigt).

3.2 Regulation des Transkriptionsfaktors Efg1p

Die Weiterleitung von extrazellulären Signalen führt letztlich zu einer Induktion oder Repression von Zielgenen durch Transkriptionsfaktoren. In *C. albicans* nimmt der Transkriptionsregulator Efg1p eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Morphogenese ein. Stämme, in denen beide Allele von *EFG1* disruptiert wurden, sind auf den meisten Induktionsmedien nicht mehr in der Lage, filamentös zu wachsen (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Außerdem ist Efg1p an der Regulation anderer morphogenetischer Prozesse beteiligt, beispielsweise am spontanen Wechsel des Phänotyps („phenotypic switching“; Sonneborn *et al.*, 1999) oder an der Bildung von Chlamydosporen (Sonneborn, 1999). Obwohl es Hinweise auf eine Kontrolle von Efg1p durch die Proteinkinase A gibt (Rademacher *et al.*, 1998; Bockmühl, 1998; Sonneborn, 1999), ist der genaue Mechanismus der Regulation von Efg1p weitgehend ungeklärt. Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte daher die molekulare Basis der Efg1-Regulation anhand von Mutagenesestudien sowie die Bedeutung der PKA-abhängigen Efg1-Aktivierung für die Morphogenese von *C. albicans* untersucht werden.

3.2.1 Mutagenese von Efg1p

Durch den Austausch bestimmter Aminosäuren und die sukzessive Verkürzung des C-terminalen Bereichs von Efg1p sollte der Einfluß dieser Elemente auf die Efg1p-vermittelte Regulation der Morphogenese bei *C. albicans* untersucht werden. Abb. 3.12 zeigt eine Übersicht der ausgetauschten Aminosäuren in einem Vergleich von Efg1p zu anderen APSES-Proteinen und zu bHLH-Proteinen aus Säugern und Hefe.

Die in Vorarbeiten durchgeführten Aminosäureaustausche T206A und T206E (Bockmühl, 1998) betreffen eine Konsensussequenz der Proteinkinase A (R-V-T; Kennelly und Krebs, 1991). Der Austausch des benachbarten T207 zu A wurde als Kontrolle ausgeführt. An Position 208-211 befindet sich mit der Folge T-M-W-E das Motiv für eine Phosphorylierung durch die Caseinkinase II (Kennelly und Krebs, 1991). Wie bei der PKA-Konsensussequenz wurde das T208 durch A und E ersetzt. Die Substitution eines T durch A macht die Übertragung einer Phosphatgruppe unmöglich, so daß eine nichtphosphorylierbare Form generiert wird. Wird hingegen T gegen E ausgetauscht, kann die negativ geladene Carboxylgruppe des Glutamats eine angehängte Phosphatgruppe vortauschen. Das derart veränderte Protein stellt somit gewissermaßen ein permanent phosphoryliertes Derivat dar (vgl. Lin und Sherman, 1997).

Der Austausch an Position 248 muß im Zusammenhang mit den aufgeführten bHLH-Proteinen aus Säugern und Hefe betrachtet werden. An dieser Position befindet sich bei diesen Proteinen ein hochkonservierter Glutamatrest, bei den APSES-Proteinen jedoch ein Threonin. Dieses Threonin könnte eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle bei den APSES-Proteinen darstellen, die in anderen bHLH-Proteinen durch die negative Ladung des Glutamatrestes einen quasi konstitutiv aktiven Zustand besäße. Um diese Hypothese zu klären, wurden Austausche des T248 zu A und E vorgenommen.

An Position 241 befindet sich ein bei den APSES-Proteinen konserviertes Leucin, während an der entsprechenden Stelle bei den anderen aufgelisteten bHLH-Proteinen ein Arginin konserviert ist, für das eine Beteiligung der DNA-Bindung von Max und MyoD beschrieben wurde (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1994). Position 262 zeigt genau das umgekehrte Phänomen: Das bei den Mitgliedern der APSES-Familie konservierte Arginin ist bei den anderen bHLH-Proteinen durch Leucin ersetzt. Da diese Unterschiede eine mögliche Konsequenz für die Regulation der betreffenden Proteine haben könnten, wurden bei Efg1p die Aminosäureaustausche L241R und R262L ausgeführt.

Antikörpern nachgewiesen. Die in Abb. 3.13 gezeigten Signale verdeutlichen, daß alle getesteten Efg1-Varianten exprimiert werden, allerdings in unterschiedlicher Form. Das Signal des Efg1-Proteins kann im Western-Blot in Form von drei Banden mit einer Größe von 88-92 kDa nachgewiesen werden. Dieses Laufverhalten, das nicht dem berechneten Molekulargewicht von 62 kDa entspricht, tritt ebenso bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* (Sonneborn, 1999), nicht jedoch bei Expression in *E. coli* auf (Weide, 1997), so daß eine pilz- bzw. eukaryontenspezifische Modifikation als Ursache für diese Anomalie angenommen wird. Da die Modifikation, die durch die oberste der drei Banden repräsentiert wird, nicht sehr stabil zu sein scheint, kann diese nach Durchführung der Immunopräzipitation meist nicht mehr nachgewiesen werden (vgl. Sonneborn, 1999). Im abgebildeten Western-Blot sind entsprechend zwei Banden für das Wildtyp-Efg1p zu erkennen, die eine Größe von 88 und 90 kDa aufweisen. Das gleiche Bandenmuster ergab sich für die Aminosäureaustausche an T206-208. Hingegen wiesen die Efg1-Varianten L241R, T248A, T248E und R262L nur Signale in Höhe der unteren Bande auf.

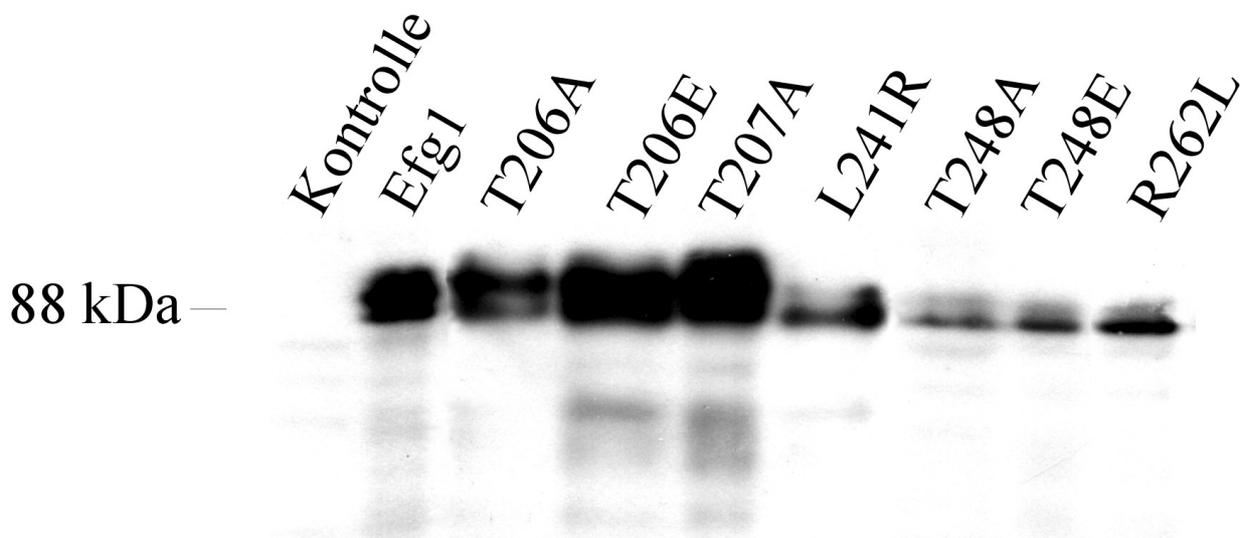


Abb. 3.13: Western-Blot-Analyse der Efg1-Varianten

Zellen des Stammes HLC67 wurden mit den Plasmiden pRC2312 (Kontrolle), pBI-HAHYD (Efg1), pDB1 (T206A), pDB2 (T206E), pDB21 (T207A), pDB9 (L241R), pDB7 (T248A), pDB8 (T248E) und pDB10 (R262L) transformiert und über Nacht in CASA zur Induktion des *PCK1*-Promotors angezogen. Die Aufreinigung über Immunopräzipitation und der Nachweis erfolgte durch Anti-HA-Antikörper (1:1000) mit Anti-Ratte-POD als Zweitantikörper (1:1000) im Chemilumineszenzassay.

3.2.1.2 Nachweis der Phosphorylierung von Efg1p

Da die Art der Laufanomalie von Efg1p häufig bei phosphorylierten Proteinen auftritt, sollte versucht werden, durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase eine Phosphorylierung von Efg1p und seinen Varianten nachzuweisen. In diesem Fall sollte es möglich sein, die Laufhöhe von Banden, die phosphorylierte Proteinformen repräsentieren, durch Dephosphorylierung zu verringern, da ein unphosphoryliertes Protein im SDS-Polyacrylamidgel schneller läuft als seine phosphorylierte Form. Dazu wurden analog zu 3.2.1.1 Proteinextrakte der Efg1-Varianten durch Immunopräzipitation gewonnen und vor der Auftrennung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt.

Wie Abb. 3.14 zeigt, ändert sich das Laufverhalten von Efg1p nach der Zugabe von alkalischer Phosphatase beträchtlich. Von den zwei Efg1-Modifikationen von 88 und 90 kDa Größe, die nach der Immunpräzipitation von Efg1p und T206A zu erkennen waren, verschwindet nach der Dephosphorylierung die obere, so daß nur noch eine Form bei 88 kDa nachweisbar war. Die Austauschvarianten T206E, T207A und T208A verhielten sich bei einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase analog (Daten nicht gezeigt). Das einzige Signal bei 88 kDa, das bei den Varianten T248A (nicht gezeigt), T248E, L241R und R262L auftrat, wurde in seiner Laufhöhe durch Phosphatasezugabe nicht verändert.

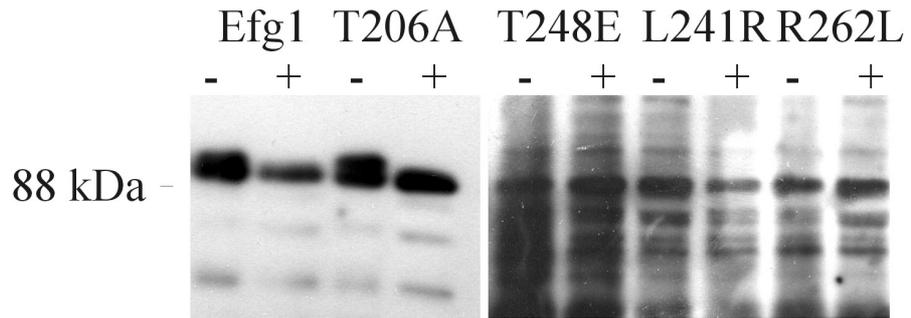


Abb. 3.14: Dephosphorylierung von Efg1-Varianten
Die aus Kulturen des mit den Vektoren pBI-HAHYD (Efg1), pDB1 (T206A), pDB8 (T248E), pDB9 (L241R) und pDB10 (R262L) transformierten Stammes HLC67 gewonnenen Proteinrohextrakte wurden über Immunpräzipitation aufgereinigt und für 30 min. bei 37°C mit alkalischer Phosphatase behandelt. Spur 1 zeigt jeweils den unbehandelten Proteinextrakt, Spur 2 den mit Phosphatase behandelten Proteinextrakt.

3.2.1.3 Nachweis der Phosphorylierung über Antikörper

Zur näheren Bestimmung der durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase nachgewiesenen Phosphorylierung wurden Proteinrohextrakte der Efg1-Varianten mit Antikörpern behandelt, die spezifisch Phosphatgruppen an Threoninresten erkennen. Für Efg1p und die Varianten T206A und T208A konnte somit eine Phosphorylierung an mindestens einem Threoninrest nachgewiesen werden (Abb. 3.15 rechts). Der Vergleich mit einem Proteinnachweis durch Anti-HA-Antikörper ergab, daß die obere der drei detektierten Efg1p-Banden mit der Bande übereinstimmt, die mithilfe der Anti-Phospho-Threonin-Antikörper ermittelt werden konnte. Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch mit den Varianten T206E und T207A erzielt (Daten nicht gezeigt). Für T248E und L241R, für die nur eine 88 kDa Bande nachweisbar war, ergab sich kein Signal aufgrund der Detektion mit Anti-Phospho-Threonin-Antikörpern. Die Varianten T248A und R262L verhielten sich

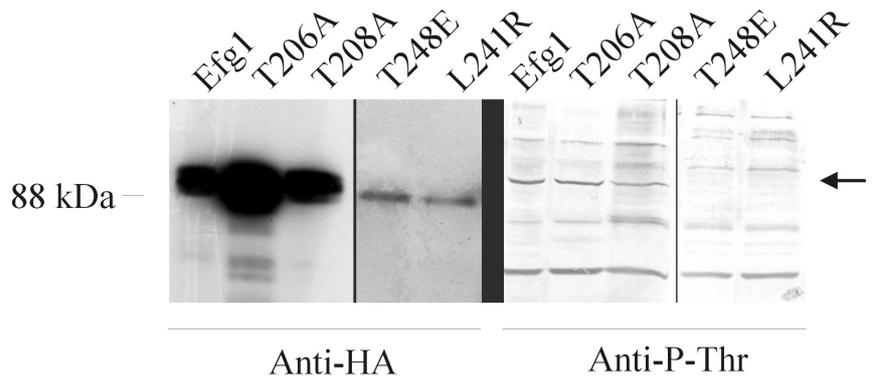


Abb. 3.15: Nachweis der Efg1-Phosphorylierung durch Phospho-Threonin-Antikörper
Rohextrakte von Zellen, die die angegebene Efg1-Variante überexprimierten wurden im Western-Blot mit Anti-HA-Antikörpern (links) und polyklonalen Anti-Phospho-Threonin-Antikörpern (rechts) behandelt. Der Nachweis erfolgte über Anti-Ratte-POD im Chemilumineszenz-Assay (Anti-HA) und über Anti-Kaninchen-AP über eine Farbreaktion mit NBT/X-Phosphat (Anti-P-Thr).

entsprechend (Daten nicht gezeigt). Die ebenfalls durchgeführte Kontrolle mit dem Leervektor pRC2312 zeigte bei keinem der verwendeten Antikörper ein Signal (nicht gezeigt).

Bei der Verwendung von immunopräzipitierten Zellextrakten konnte durch Anti-Phospho-Threonin-Antikörper für keine der getesteten Varianten eine Phosphorylierung gezeigt werden.

In Vorarbeiten konnte bereits ermittelt werden, daß die Behandlung mit Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpern zu keinem Signal bei Efg1p führt (A. Sonneborn, pers. Mitteilung). Ebenso konnten mithilfe von Anti-Acetyl-Lysin-Antikörpern keine entsprechenden Modifikationen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.4 Überexpression der Efg1-Austauschvarianten

Die Überexpression von *EFG1* führt in Form von Pseudohyphenbildung zu einem charakteristischen Phänotyp (Stoldt *et al.*, 1997). Dieses Phänomen kann genutzt werden, um zu überprüfen, ob eine Expression von *EFG1* stattfindet, etwa als Kontrolle der Transformation oder als Bestätigung der Funktionalität eines Efg1-Fusionsproteins. Der Nachweis dieses Phänotyps sollte für die durch Aminosäuresubstitution gewonnenen Efg1-Varianten als erste Überprüfung der Efg1p-Funktion dienen. Aus diesem Grund wurden Zellen der *efg1*-Nullmutante HLC67 mit Überexpressionsplasmiden der Efg1-Varianten transformiert und in Minimalmedium mit 2% Casaminsäuren zur Induktion des *PCK1*-Promotors angezogen.

Aus Abb. 3.16 geht hervor, daß durch die Überexpression von *EFG1* sowie der Varianten

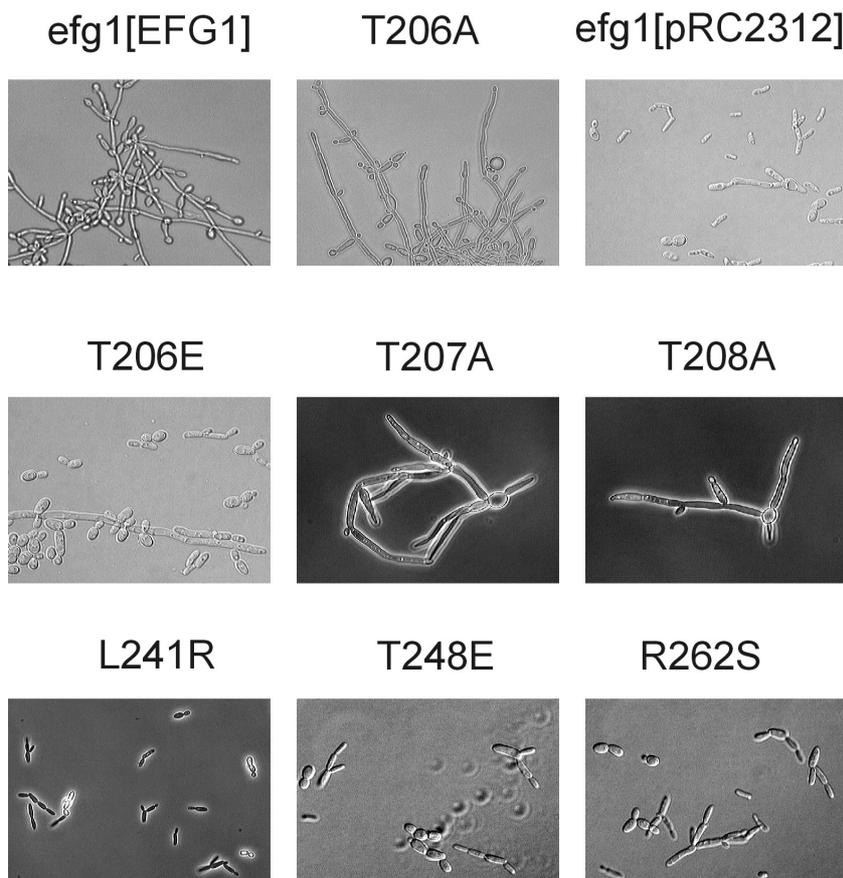


Abb. 3.16: Überexpression von Efg1-Varianten

Mit den Vektoren pBI-HAHYD (Efg1), pDB1 (T206A), pRC2312 (Kontrolle), pDB2 (T206E), pDB1 (T207A), pDB5 (T208A), pDB8 (T248E), pDB9 (L241R) und pDB10 (R262L) transformierte Zellen des Stammes HLC67 wurden zweimal über Nacht in 2% CASA angezogen und die Bildung von Pseudohyphen mikroskopisch dokumentiert.

T206A, T206E, T207A und T208A die Bildung von Pseudohyphen ausgelöst wurde. Diese zeichneten sich durch Zellketten aus, deren Zellelemente stark elongiert sind, so daß sich ein ausgesprochen filamentöser Phänotyp ergab. Im Gegensatz dazu rief das Fehlen der *EFG1*-Expression, wie bei der Kontrolle ersichtlich, die Bildung von stäbchenförmigen Zellen hervor, die allenfalls Ketten von einigen Zellen Länge ausbildeten. Dieser Phänotyp fand sich

auch bei der Expression der Varianten L241R, T248E und R262L. Obwohl deren Expression im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2.1.1), deutete der Überexpressionsphänotyp nicht auf eine reguläre Efg1-Aktivität hin.

3.2.1.5 Hyphenbildung von Efg1-Varianten auf festen Medien

Da Efg1p für die Bildung von Hyphen auf den meisten Medien essentiell ist, erschien es sinnvoll, die Aminosäureaustauschvarianten von Efg1p auf ihre Fähigkeit zu überprüfen, auf festem Spidermedium filamentöses Wachstum zu vermitteln. Dieses Experiment sollte Aufschluß darüber geben, ob die Induktion von echten Hyphen aufgrund eines definierten Aminosäureaustausches gehemmt werden kann. Im Gegensatz zum vorher beschriebenen, künstlichen Überexpressionsphänotyp, nähern sich diese Bedingungen den natürlichen Verhältnissen an, da auch *in vivo* durch bestimmte Umweltbedingungen die Hyphenbildung angeregt wird.

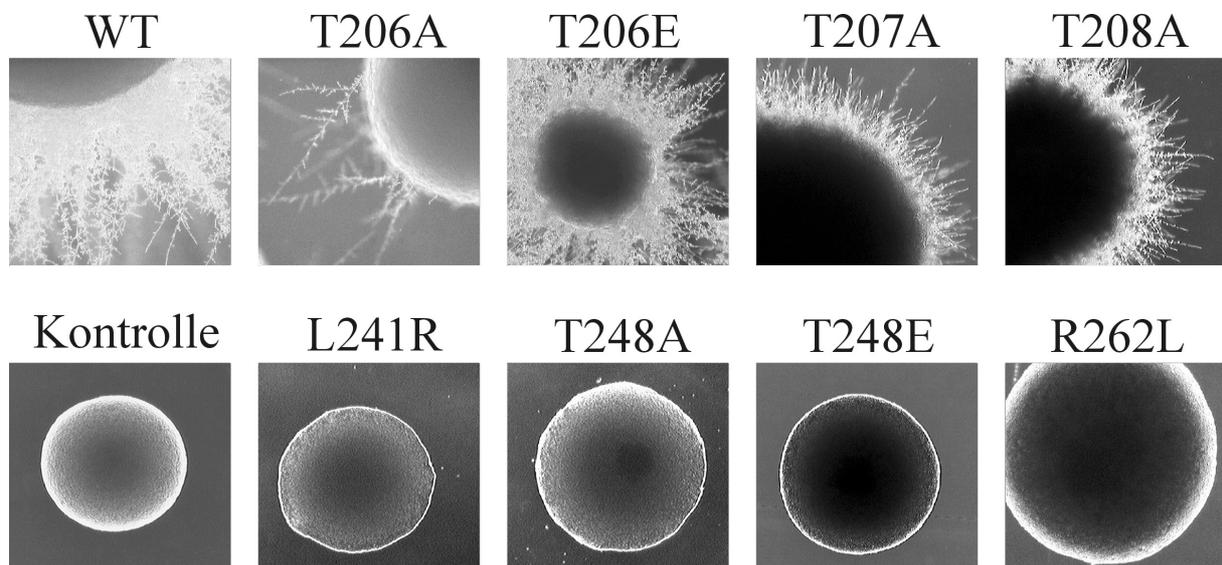


Abb. 3.17: Hyphenbildung auf Spidermedium

Zellen des Stammes HLC67 wurden mit den Plasmiden pBI-HAHYD (WT), pDB1 (T206A), pDB2 (T206E), pDB21 (T207A), pDB5 (T208A), pRC2312 (Kontrolle), pDB8 (T248E), pDB9 (L241R) und pDB10 (R262L) transformiert und auf Spiderplatten ausgestrichen. Die Hyphenbildung wurde nach dreitägiger Inkubation bei 37°C fotografisch festgehalten.

Die bereits beschriebenen Efg1-Varianten wurden dazu im *efg1*-Deletionsstamm HLC67 exprimiert und die Hyphenbildung auf festem Spidermedium nach drei Tagen protokolliert. Daraus ergab sich im Prinzip ein ähnliches Ergebnis wie für den Überexpressionsphänotyp. L241R, T248E und R262L exprimierende Zellen zeigten wie die Kontrolle keinerlei filamentöses Wachstum auf Spidermedium, während die Hyphenbildung durch die Expression der Varianten T207A und T208A der des Wildtyps entsprach. Wie bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, führt der Austausch des Threonin 206 zu Alanin zu einer Unterdrückung der Hyphenbildung auf Spidermedium, während der Austausch zu Glutamat einen hyperfilamentösen Phänotyp zur Folge hat (Bockmühl, 1998). Dieses Ergebnis weicht von den in 3.2.1.4 ermittelten Daten ab, da mit T206A eine Efg1-Variante vorliegt, die zwar zur überexpressionsbedingten Induktion von Pseudohyphen befähigt ist, deren Expression jedoch nicht zur Hyphenbildung auf Spidermedium führt.

3.2.1.6 Hyphenbildung von *Efg1*-Varianten in flüssigen Induktionsmedien

Um eine quantitative Aussage über die Hyphenbildung in verschiedenen Induktionsmedien treffen zu können, wurde die Bildung von echten Hyphen auch in flüssigem Spidermedium, 5% Serum und GlcNAc beobachtet. GlcNAc ist eines der wenigen Agentien, für die eine spezifische Induktionwirkung bei der Hyphenbildung von *C. albicans* nachgewiesen werden konnte (Cassone *et al.*, 1985). Im Gegensatz dazu sind bei Spidermedium oder Serum die hypheninduzierenden Komponenten nicht näher spezifiziert.

Während Zellen des Stammes HLC67, die variante *Efg1*-Proteine mit Aminosäureaustauschen an Position 207 und 208 produzierten, keine Beeinträchtigung der Hyphenbildung im Vergleich zum Wildtyp zeigten, führte die Expression der Varianten T248A, T248E, L241R und R262L in allen getesteten Medien zu einem afilamentösen Wachstum (Daten nicht gezeigt). Abb. 3.18 zeigt die Induktionsprofile der Varianten T206A und T206E im Vergleich zum Wildtypprotein und einer Negativkontrolle.

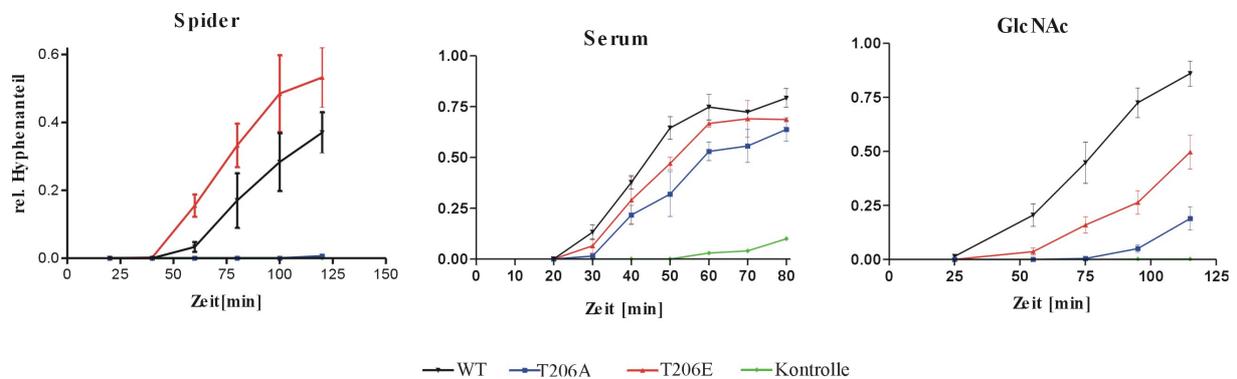


Abb. 3.18: Hypheninduktion in Flüssigmedien

Je drei unabhängige HLC67-Transformanten mit integrierten Plasmiden pBI-HAHYD (WT), pDB1 (T206A), pDB2 (T206E) oder dem Kontrollvektor pRC2312 wurden über Nacht in 2% CASA vorgezogen und dann in den angegebenen Medien auf Hyphenbildung getestet. Die gebildeten Keimschläuche wurden als Anteil der Gesamtzellen gezählt.

In flüssigem Spidermedium formten T206A-exprimierende HLC67-Zellen wie die Negativkontrolle über den gewählten Zeitraum keine Hyphen aus. Die Geschwindigkeit der Hyphenbildung aufgrund der Expression von T206E übertraf hingegen sogar die der Positivkontrolle. Dieser Effekt konnte bei den beiden anderen getesteten Induktionsmedien nicht beobachtet werden. Die Hypheninduktion durch 5% Serum führte zu vergleichbaren Raten der Hyphenbildung bei Expression von *Efg1p*, T206E und T206A, wobei die Ausbildung von Filamenten im Falle der T206A-Variante geringfügig, aber signifikant langsamer verlief als die des Wildtyps, während durch T206E ein intermediärer Effekt hervorgerufen werden konnte. In diesem Induktionsmedium zeigten sich allerdings nach etwa einer Stunde auch bei der Negativkontrolle erste Keimschläuche, die zu einem filamentösen Wachstum auf niedrigem Niveau führten. Bei der Induktion durch GlcNAc war die Bildung von Hyphen durch T206E im Vergleich zum Wildtyp bereits deutlich verlangsamt und bei der Expression von T206A noch stärker beeinträchtigt. Die Negativkontrolle blieb hier vollkommen afilamentös.

3.2.1.7 Chlamydosporenbildung

Ein wichtiger morphogenetischer Phänotyp von *C. albicans* ist die Ausbildung von Chlamydosporen. Dies sind sphärische Zellen mit einer besonders dicken, stark lichtbrechenden Zellwand, die im allgemeinen als Überdauerungsform angesehen werden. Der genaue Zweck der Chlamydosporen ist allerdings nicht bekannt, zumal deren Differenzierung bisher nur *in vitro* unter Nährstoffmangelbedingungen beobachtet werden konnte. Ihre Ausbildung ist allerdings ein Charakteristikum von *C. albicans*, weshalb sie in der klinischen Diagnostik zur Identifizierung dieser Spezies dient (Odds, 1988).

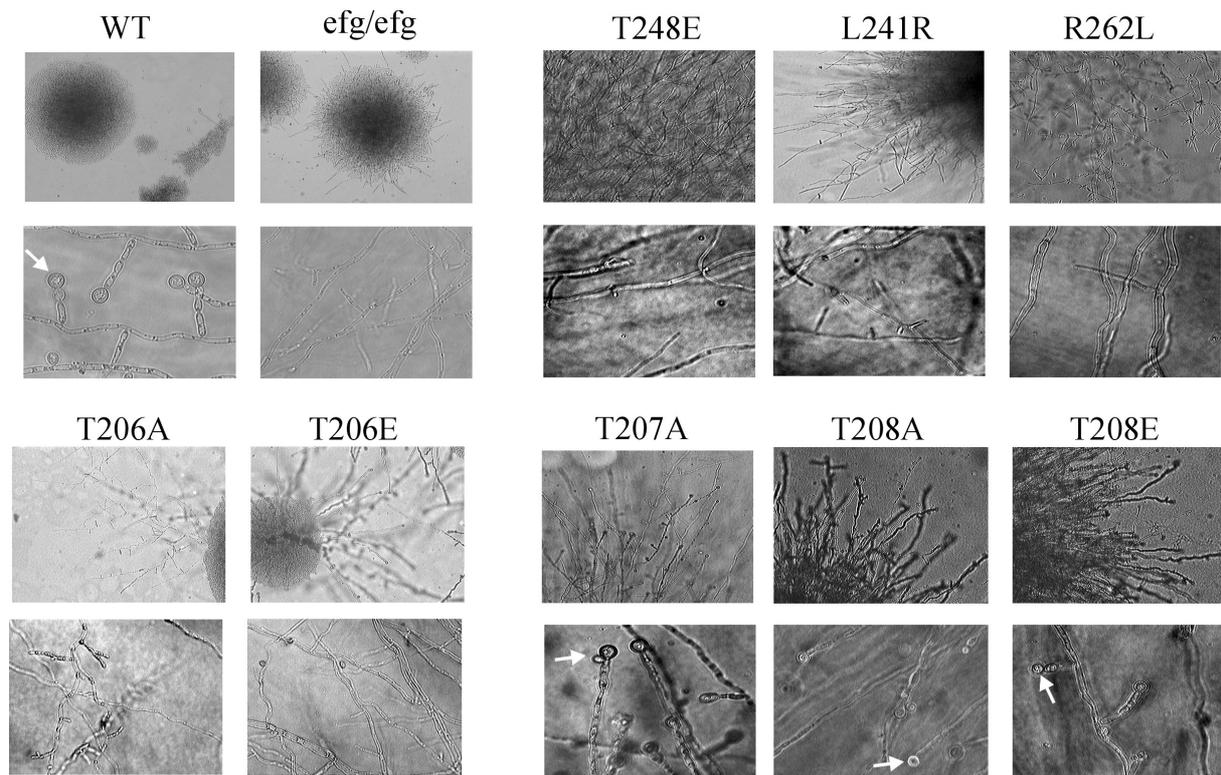


Abb. 3.19: Chlamydosporenbildung

Zellen des Stammes HLC67 wurden mit den Plasmiden pBI-HAHYD (WT), pRC2312 (*efg/efg*), pDB1 (T206A), pDB2 (T206E), pDB21 (T207A), pDB5 (T208A), pDB6 (T208E), pDB8 (T248E), pDB9 (L241R) und pDB10 (R262L) transformiert und auf Maismehlagar mit 0,33% Tween-80 ausgestrichen. Nach Auflegen eines sterilen Deckglases zur Erzeugung eines mikroanaeroben Milieus wurde die Chlamydosporenbildung (Pfeil) nach einwöchiger Inkubation bei 25°C dokumentiert. Die jeweils oberen Abbildungen zeigen eine Übersicht zur Verdeutlichung des filamentösen Phänotyps, die unteren eine vergrößerte Ansicht zur Veranschaulichung der Chlamydosporenbildung.

Wie Sonneborn (1999) zeigen konnte, ist *EFG1* essentiell für die Bildung von Chlamydosporen. Die *efg1*-Nullmutante bildet auf Induktionsmedium, bestehend aus Maismehlagar mit 0,33% Tween-80, unter mikroanaeroben Bedingungen, die durch Wachstum unter einem Deckglas erzeugt wurden, keine Chlamydosporen aus. Hingegen sind Stämme, in denen der andere für die Morphogenese wichtige Transkriptionsfaktor *CPH1* disruptiert wurde, weiterhin in der Lage, Chlamydosporen zu differenzieren. Bemerkenswerterweise zeigen *efg1*-Disruptanten unter den gewählten Bedingungen ein stark filamentöses Wachstum, während sie auf Hypheninduktionsmedien a filamentös wachsen. Dabei scheint die *efg1*-Deletion die Filamentbildung unter anaeroben Bedingungen sogar zu begünstigen (Sonneborn, 1999). Zusätzlich wurde getestet, ob die Deletion einer oder beider *TPK*-Isoformen die Chlamydospo-

rendifferenzierung beeinflusst. Dabei zeigte sich, daß alle getesteten *tpk*-Deletionsstämme, einschließlich der konditionalen Doppeldisruptante M231 in der Lage waren, Chlamydosporen zu bilden. Ebenso wiesen alle Kulturen filamentöses Wachstum auf.

Um zu zeigen, welchen Einfluß die Aminosäureaustausche auf die Fähigkeit von Efg1p, die Chlamydosporenbildung zu regulieren, ausüben, wurden HLC67-Transformanten, die die entsprechenden Varianten exprimieren, auf Maismehlagar mit 0,33% Tween-80 ausgestrichen, mit einem sterilen Deckglas bedeckt und nach etwa 7 Tagen auf die Differenzierung von Chlamydosporen mikroskopisch untersucht. Die Verwendung von Nährstoffmangelbedingungen erlaubte dabei die Benutzung des *PCK1*-Promotors, der unter diesen Bedingungen induziert ist.

Wie aus Abb. 3.19 zu ersehen ist, waren nicht alle der Efg1-Varianten exprimierenden Zellen zur Differenzierung von Chlamydosporen befähigt. Der Aminosäureaustausch an T206 bewirkte unabhängig von der substituierten Aminosäure ein Ausbleiben der Chlamydosporenbildung (unten links); dagegen beeinflussten die Austausch an den benachbarten Positionen T207 und T208 (unten rechts) die Chlamydosporenbildung nicht.. Im Gegensatz dazu waren Zellen, die die Varianten T248A (nicht gezeigt), T248E, L241R und R262L exprimierten, nicht zur Differenzierung von Chlamydosporen fähig (oben rechts).

Zusammenfassend bedeutet dies, daß ein Aminosäureaustausch an Position 207 und 208 keinen Einfluß auf die Regulation der Chlamydosporenbildung durch Efg1p hat. Hingegen verliert Efg1p seine Fähigkeit, die Differenzierung von Chlamydosporen zu vermitteln, wenn die Aminosäuren L241, T248 oder R262 ausgetauscht werden. Auch die Substitution des T206 führt zu einem Verlust der Chlamydosporenbildung.

3.2.1.8 Untersuchungen an C-terminal verkürzten Varianten von Efg1p

Während die bisher charakterisierten Aminosäureaustausche bei Efg1p definierte Veränderungen innerhalb der APSES-Domäne darstellten, sollte im folgenden untersucht werden, welche Auswirkung die sukzessive Verkürzung des C-terminalen Bereichs auf die Eigenschaft von Efg1p als Regulator der Morphogenese hat.



Abb. 3.20: Vergleich von C-terminal verkürzten Efg1-Varianten

Die durch Einfügen von Stopkodons mittels Basenaustauschmutagenese im *EFG1*-Expressionsvektor pBI-HAHYD gewonnenen Efg1-Varianten sind mit der Lage der bHLH-(APSES)-Domäne im Vergleich zur nicht verkürzten Efg1p-Proteinsequenz dargestellt. Im Gegensatz zum 552 AS langen Efg1-Protein, kodieren die Mutanten für Proteine mit einer berechneten Länge von 420, 308 und 188 AS. Im letzteren fehlt die kodierende Sequenz für die bHLH-Domäne.

Dazu wurden mittels Basenaustauschmutagenese in *EFG1*-Expressionsvektoren an verschiedenen Positionen innerhalb des offenen Leserahmens von *EFG1* Stopkodons eingeführt, die zu einer Expression von C-terminal verkürzten Varianten von Efg1p führen sollte. Zum Nachweis der Proteine wurde die für das HA-Epitop kodierende Basensequenz am 5'-Ende des *EFG1*-Leserahmens mitexprimiert. Abb. 3.20 zeigt einen schematischen Vergleich der

verkürzten Proteine mit der Lage der bHLH-(APSES)-Domäne. Oben ist das 552 AS große Efg1-Wildtypprotein dargestellt; darunter die C-terminal verkürzten Formen mit Längen von 420, 308 und 188 AS.

3.2.1.8.1 Western-Blot Analyse der verkürzten Efg1-Varianten

Um nachzuweisen, daß die C-terminal verkürzten Efg1-Derivate exprimiert werden, wurden Proteinrohextrakte der entsprechenden Expressionsstämme mithilfe von Anti-HA-Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Abb. 3.21 zeigt, daß lediglich das 420 AS-lange

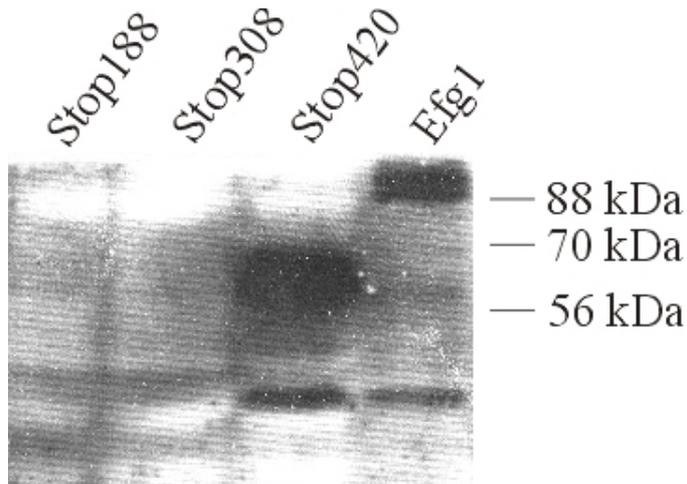


Abb. 3.21: Nachweis verkürzter Efg1p-Varianten im Western-Blot
Rohextrakte von HLC67-Zellen, transformiert mit pBI-HAHYD (Efg1p), pDB (Stop420), pDB (Stop308) und pDB (Stop188) wurden im Western-Blot mit Anti-HA-Antikörpern behandelt. Der Nachweis erfolgte über Anti-Ratte-POD im Chemilumineszenz-Assay

Protein exprimiert wurde. Diese Variante hatte im Western-Blot eine Größe von etwa 60 kDa, was nicht der berechneten Größe von 49 kDa entspricht. Interessanterweise trat auch im Falle der auf 420 AS verkürzten Variante analog zu Efg1p eine etwas größere zweite Bande auf. Die anderen Proteine von 308 und 188 AS Länge waren im Western-Blot nicht nachweisbar.

3.2.1.8.2 Überexpression der verkürzten Efg1-Varianten

Zur Kontrolle des Überexpressionsphänotyps der C-terminal verkürzten Efg1-Varianten wurden Zellen des Stammes HLC67, die mit Expressionsvektoren pBI-HAHYD (Efg1p), pDB22 (Stop420), pDB19 (Stop308) und pDB18 (Stop188) transformiert worden waren, zur Induktion des *PCK1*-Promotors in Medium mit 2% Casaminsäuren angezogen und die Zellformen dokumentiert.

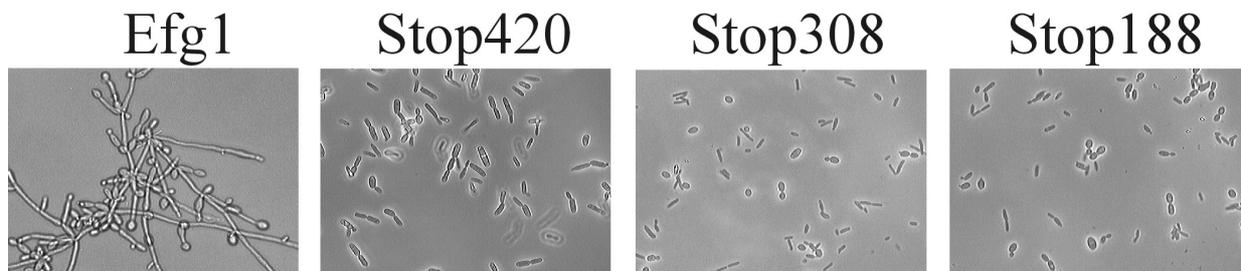


Abb. 3.22: Überexpression verkürzter Efg1-Derivate

Mit pBI-HAHYD (Efg1), pDB22 (Stop420), pDB19 (Stop308) und pDB18 (Stop188) transformierte Zellen des Stammes HLC67 wurden zweimal über Nacht in Minimalmedium mit 2% Casaminsäuren angezogen und zur Kontrolle der Pseudohyphenbildung mikroskopisch betrachtet.

Dabei zeigte sich, daß die mit pDB18 und pDB19 transformierten Zellen aufgrund der fehlenden Proteinexpression (vgl. 3.2.1.8.1) einen Phänotyp aufwiesen, wie er für *efg1*-Nullmutanten typisch ist (Abb. 3.22) Aber auch die Expression des 420 AS langen Efg1-Derivats führte zu einer vergleichbaren Zellform. Keine der verkürzten Varianten war also in der Lage, wie das Efg1-Wildtypprotein, bei Überexpression die Bildung von Pseudohyphen hervorzurufen.

3.2.1.8.3 Hyphenbildung von verkürzten Efg1-Varianten

Um zu überprüfen, ob C-terminal verkürzte Derivate von Efg1p in der Lage sind, auf festem Spidermedium die Bildung von Hyphen zu induzieren, wurden die mit den entsprechenden Expressionsvektoren transformierten HLC67-Zellen auf Spidermedium ausplattiert und die Hyphenbildung nach drei Tagen protokolliert (Abb. 3.23) Erwartungsgemäß konnte schon aufgrund der fehlenden Proteinexpression für die 188 und 308 AS langen Varianten kein filamentöses Wachstum beobachtet werden. Zellen, die das 420 AS lange Efg1-Derivat exprimierten, zeigten hingegen eine charakteristische Kolonief orm. Aus der prinzipiell a filamentösen runden Kolonie bildete sich an einer Stelle ein gerichteter Auswuchs der am Ende filamentöse Strukturen zeigte. Daneben zeigten sich auch an anderen Bereichen einzelne kurze Hyphen. Dieser Phänotyp ist in keiner Weise mit der Hyphenbildung des Wildtyps zu vergleichen, dennoch ist eine prinzipielle Fähigkeit zur Induktion filamentösen Wachstums bei der 420 AS langen Efg1-Variante zu beobachten.

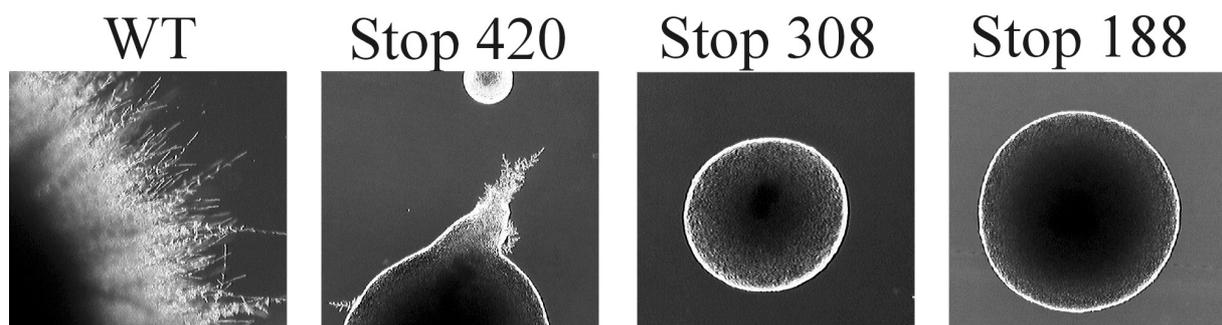


Abb. 3.23: Hypheninduktion durch verkürzte Efg1-Varianten auf Spidermedium
Mit pBI-HAHYD (Efg1p), pDB22 (Stop420), pDB19 (Stop308) und pDB18 (Stop188) transformierte Zellen des Stammes HLC67 wurden auf Spidermedium ausgestrichen und die Bildung von Hyphen nach dreitägiger Inkubation bei 37°C festgehalten.

3.2.2 Regulation von Efg1p durch die Proteinkinase A

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Regulation des Transkriptionsfaktors Efg1p bei der Steuerung der *C. albicans*-Morphogenese. Mehrere Hinweise sprechen in diesem Zusammenhang für Efg1p als eine Komponente des cAMP-abhängigen Proteinkinase A Signalweg.

1. Die Überexpression des Chaperonins Cct8p aus *C. albicans* hemmt sowohl die durch cAMP als auch die durch Efg1p induzierte Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* (Rademacher *et al.*, 1998)
2. Der Hyphendefekt aufgrund einer *tpk2*-Deletion kann durch die Überexpression von *EFG1* supprimiert werden, während die *TPK2*-Überproduktion nicht die Hyphenbildung in einer *efg1*-Nullmutante zu induzieren vermag (Sonneborn, 1999).

- Die Mutation der potentiellen Zielsequenz für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A beeinträchtigt in starkem Maße die Fähigkeit von Efg1p zur Induktion von hyphalem Wachstum auf Spidermedium.

Diese Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, indem eine systematische Untersuchung der epistatischen Verhältnisse in den für die Morphogenese wichtigen Signaltransduktionswegen durchgeführt wurde. Weiterhin sollte versucht werden, eine direkte Interaktion von Efg1p und Tpk1p oder Tpk2p biochemisch nachzuweisen.

3.2.2.1 Epistase-Untersuchungen zur Komplementation von Hyphendefekten

Analog zur Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* sind in *C. albicans* bislang zwei Signalwege bekannt, über die die Bildung von Hyphen reguliert wird. Der eine Weg läuft über eine MAPK-Kaskade, in der der Transkriptionsfaktor Cph1p durch die MAPK Cek1p aktiviert wird. Der zweite Weg beinhaltet eine Aktivierung der Proteinkinase A durch die Erhöhung des cAMP-Spiegels. Mithilfe von Komplementationsversuchen sollte im folgenden nachgewiesen werden, daß Efg1p unterhalb der Proteinkinase A in einem gemeinsamen Signalweg, parallel zur MAPK-Kaskade angesiedelt werden kann.

Dazu wurden Stämme herangezogen, in denen Gene disruptiert worden waren, die für Komponenten der oben genannten Signalwege kodieren. Im einzelnen betraf dies die Gene *CEK1* und *CPH1* aus dem MAPK-Weg, die Gene für die katalytischen Untereinheiten der PKA, *TPK1* und *TPK2* sowie *RAS1* und *EFG1*. Jeder dieser Stämme wurde mit einem Vektor, durch den eines der aufgeführten Gene überexprimiert wird oder mit einem Leervektor transformiert. Anschließend wurden alle Transformanten auf Spidermedium ausgestrichen und die Hyphenbildung protokolliert, so daß sich eine Matrix ergibt, auf der abgelesen werden kann, welcher durch Disruption eines bestimmten Gens ausgelöste Hyphendefekt durch Überexpression eines anderen Gens supprimiert werden kann. Durch Auswertung dieser Matrix erhält man Aussagen darüber, ob ein Protein im gleichen Weg wie ein anderes wirkt, und ob es oberhalb oder unterhalb in der Signalkette liegt. Tabelle 3.2 faßt die in Abb. 3.24 gezeigten Ergebnisse der epistatischen Untersuchungen zusammen

	<i>EFG1</i>	<i>TPK1</i>	<i>TPK2</i>	<i>CEK1</i>	<i>RAS1</i>	<i>CPH1</i>	Kontrolle
<i>efg1</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>tpk1</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>tpk2</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>cek1</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>ras1</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>cph1</i>	-	+	+	-	-	+	-

Tab. 3.2: Suppression morphogenetischer Defekte

Getestet wurden die in Abb. 3.24 angegebenen Transformanten auf die Fähigkeit, einen durch Disruption hervorgerufenen Hyphendefekt zu komplementieren. Die Tabelle zeigt die vereinfachte Darstellung der in Abb. 3.24 beschriebenen Effekte.

Senkrecht: getestete Deletionsstämme; waagrecht: überexprimierte Gene

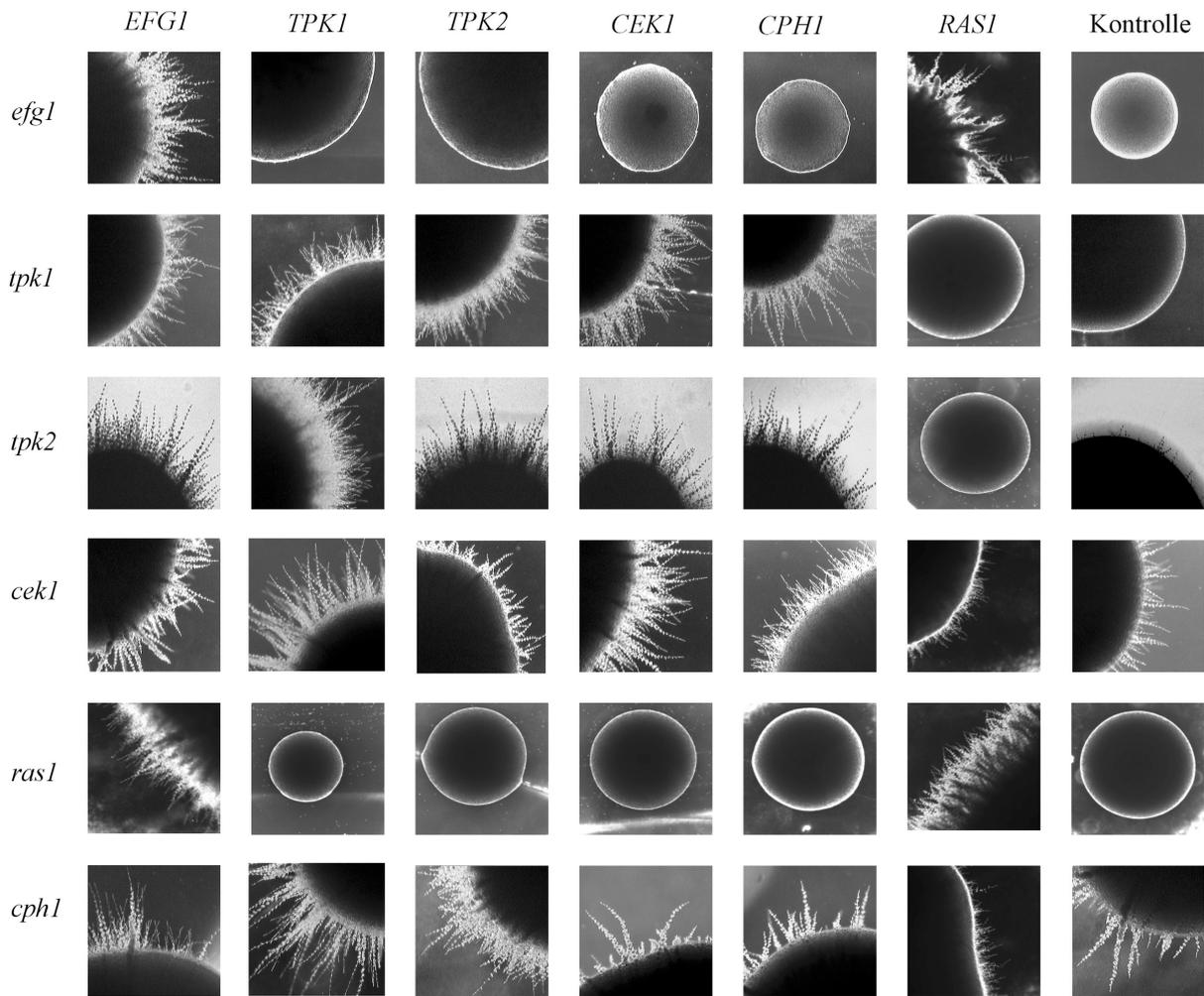


Abb. 3.24: Suppression morphogenetischer Defekte

Nullmutanten mit Defekten in der Hyphenbildung wurden mit Expressionsvektoren der angegebenen Gene transformiert und für drei Tage auf Spidermedium angezogen. Die Inkubation erfolgte für die *tpk2*-Disruptante zur Veranschaulichung des Hyphendefekts bei 30°C, für alle anderen Stämme bei 37°C. Die verwendeten Stämme HLC67 (*efg1*), *ras1-2/ras1-4* (*ras1*), IIHB6-4a (*tpk1*), AS1 (*tpk2*), CK43B-16L (*cek1*) und JKC18 (*cph1*) wurden mit den Plasmiden pBI-HAHYD (*EFG1*), pQF145.2 (*RAS1*), pBI/His.-C.TPK1 (*TPK1*), pBI-TPK (*TPK2*), pCCA4 (*CEK1*) und pLJ19 (*CPH1*) sowie dem Leervektor pRC2312 (Kontrolle) transformiert.

Der durch die Deletion von *EFG1* hervorgerufene Hyphendefekt kann von keinem der überexprimierten Gene außer *EFG1* und *RAS1* supprimiert werden, während die Hyphenbildung in *tpk1*- oder *tpk2*-Deletionsstämmen nicht nur durch eine Überexpression von *EFG1*, sondern ebenso durch die Überexpression der *TPK*-Isoformen sowie *CEK1* und *CPH1* wiederhergestellt werden kann. Die Beurteilung für die *cek1*- und *cph1*-Deletionsstämmen ist etwas schwieriger, da der Hyphendefekt hier nicht in dem Maße ausgeprägt ist, wie bei *efg1*- oder *tpk*-Deletionen. Sowohl der *cek1*- als auch der *cph1*-Deletionsstamm bilden auf Spidermedium noch Hyphen. Diese Hyphenbildung wird im Falle der *cek1*-Nullmutante durch Überexpression von *EFG1*, *TPK1*, *CEK1* und *CPH1* verstärkt, während die Überexpression von *TPK2* oder *RAS1* keinen Effekt zeigt. Der Hyphendefekt einer *cph1*-Deletion kann durch Überexpression von *TPK1* und *TPK2*, nicht jedoch durch *EFG1*, *RAS1* und *CEK1* supprimiert werden. Allerdings komplementiert auch die *CPH1*-Überproduktion den Deletionsphänotyp einer *cph1*-Nullmutante nicht. Die Deletion von *RAS1* kann nur mit *RAS1* und *EFG1* komplementiert werden. Bei dem Versuch der *ras1*-Komplementation durch die *TPK*-Isoformen wurde dem Medium cAMP zugesetzt, da eine *ras1*-Deletion den cAMP Spiegel senkt und

somit die Tpk-Aktivierung inhibiert. Dennoch zeigte sich keine Komplementation durch die Überexpression von *TPK1* oder *TPK2*.

3.2.2.2 Suppression des *TPK2*-assoziierten Hyphendefektes in flüssigen Induktionsmedien

Wie in 3.1.7 beschrieben, bestehen bei *tpk*-Deletionsstämmen Unterschiede im Hyphendefekt auf festen und in flüssigen Induktionsmedien. Um nachzuweisen, daß die epistatischen Verhältnisse genereller Natur sind, wurde beispielhaft getestet, ob sich der Hyphendefekt des *tpk2*-Deletionsstammes ebenfalls durch Überexpression der beiden *TPK*-Isoformen oder *EFG1* supprimieren läßt.

Dazu wurde der *tpk2*-Deletionsstamm AS1 mit Plasmiden transformiert, die *TPK1*, *TPK2* oder *EFG1* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors exprimieren. Nach der Anzucht über Nacht in Minimalmedium mit 2% Casaminsäuren wurden die verdünnten Zellen eine Stunde in Medium inkubiert, dem 5% Pferdeserum zugegeben wurde und die Hyphenbildung fotografisch dokumentiert. Wie in Abb. 3.25 zu erkennen ist, konnte der durch die Deletion beider *TPK2*-Allele verursachte Defekt der Hyphenbildung in flüssigem Medium mit Serum als Induktor sowohl durch die Überexpression einer der *TPK*-Isoformen als auch durch *EFG1* komplementiert werden. Die Suppression eines Hyphendefektes durch entsprechende Komponenten des gleichen Signaltransduktionswegs konnte also als allgemeingültiger Mechanismus für flüssige und feste Medien bestätigt werden.

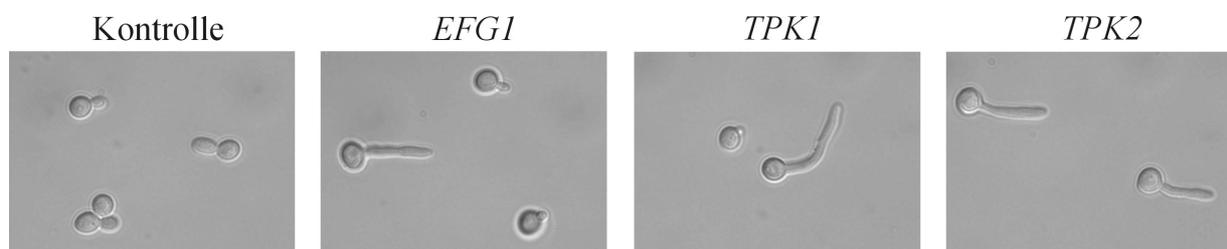


Abb 3.25: Komplementation des Hyphendefektes eines *tpk2*-Deletionsstammes
Zellen des Stammes AS1 wurden mit den Plasmiden pRC2312 (Kontrolle), pBI-HAHYD (*EFG1*), pBI/His.-C.*TPK1* (*TPK1*) oder pBI-*TPK2* (*TPK2*) transformiert und über Nacht in 2% CASA angezogen. Anschließend wurden die Kulturen 1:10 in YP+5% Serum verdünnt und die Hyphenbildung nach einer Stunde beobachtet.

3.2.2.3 Komplementation von Hyphendefekten durch die *Efg1*-Varianten T206A und T206E

Um den Einfluß eines Aminosäureaustausches an der potentiellen PKA-Phosphorylierungsstelle von Efg1p zu testen, wurden die Varianten T206A und T206E in verschiedenen Deletionsstämmen überexprimiert. Auf festem Spidermedium sollte überprüft werden, ob durch die Überexpression der *EFG1*-Varianten eine Komplementation des Defektes in der Hyphenbildung möglich ist. Zusätzlich zu den in 3.2.2.1 benutzten Deletionsstämmen wurde die Uridin-auxotrophe *efg1/cph1*-Doppeldisruptante CDB1 verwendet, die durch FOA-Selektion aus dem Uridin-prototrophen Stamm HLC54 generiert wurde (Daten nicht gezeigt).

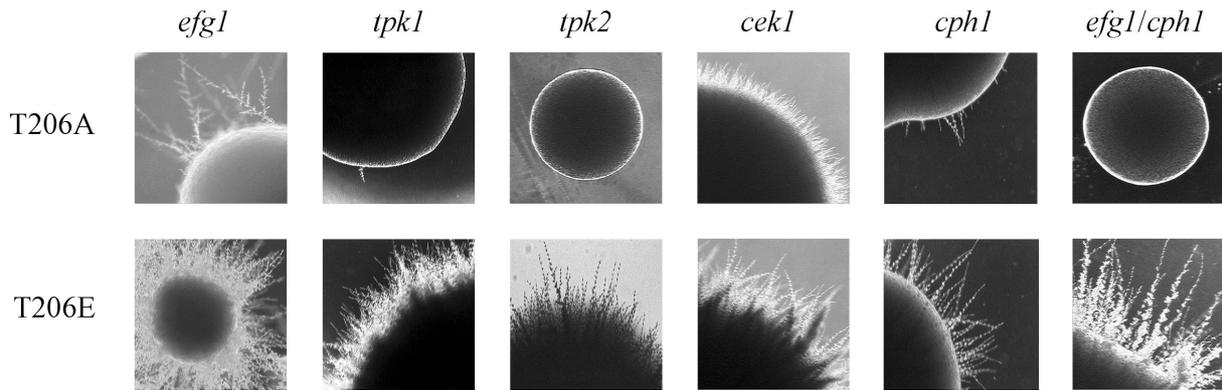


Abb. 3.26: Komplementation von Hyphendefekten durch die Efg1-T206A und T206E-Varianten
Die Vektoren pDB1 (T206A) und pDB2 (T206E) wurden in die Stämme HLC67 (*efg1*), IIHB6-4a (*tpk1*), AS1 (*tpk2*), CK43B-16L (*cek1*), JKC18 (*cph1*) und CDB1 (*cph1/efg1*) transformiert und diese für drei Tage bei 30° (AS1) oder 37°C (andere Stämme) auf Spidermedium angezogen.
Obere Reihe: Suppression durch *EFG1*-T206A; untere Reihe: Suppression durch *EFG1*-T206E

Wie Abb. 3.26 zeigt, war es möglich, mittels Überexpression der T206E Variante die Hyphendefekte aller Deletionsstämmen zu komplementieren. Lediglich die Hyphenbildung des *cph1*-Deletionsstammes konnte nicht durch eine T206E-Expression wiederhergestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte durch eine T206A-Überexpression in keinem der getesteten Fälle ein Defekt in der Hyphenbildung supprimiert werden. Dieser Befund unterstützt die in 3.2.1.6 gefundenen Hinweise auf eine Aktivierung von Efg1p durch eine PKA-Phosphorylierung an T206.

3.2.2.4 Versuch des Nachweises der Interaktion von Efg1p und der Proteinkinase A

Nachdem es gelungen war, über epistatische Analysen weitere indirekte Beweise für eine Regulation von Efg1p durch die Proteinkinase A zu erlangen, sollte zusätzlich versucht werden, eine direkte Interaktion von Efg1p mit Tpk1p oder Tpk2p biochemisch nachzuweisen. Dieser Nachweis sollte über eine Interaktion im Zwei-Hybrid-System in *S. cerevisiae* und über Coimmunopräzipitation geführt werden.

3.2.2.4.1 Zwei-Hybrid-Analyse der Interaktion von Efg1p und Tpk1p bzw. Tpk2p

Mithilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems können unter bestimmten Voraussetzungen *in vivo* Interaktionen zweier Proteine nachgewiesen werden (Fields und Song, 1989). Das in dieser Arbeit benutzte Verfahren nach James *et al.* (1996) verwendet ein Gal4-System mit mehreren Reportergenen. In diesem System wird ein Protein an die DNA-Bindedomäne, das andere an die Aktivierungsdomäne von Gal4p aus *S. cerevisiae* fusioniert. Im Falle einer Interaktion beider Proteine ist dieses künstliche Dimer in der Lage, über Gal4-regulierte Promotoren Reportergene in einem speziell für dieses Zwei-Hybrid-System entwickelten Reporterstamm zu aktivieren. Bei den Reportergenen handelt es sich um *HIS3* und *ADE2* aus *S. cerevisiae*, die ein Wachstum des auxotrophen Reporterstammes auf Medium ohne Histidin bzw. Adenin vermitteln. Zusätzlich steht das bakterielle *lacZ*-Gen als Reporter zur Verfügung. Die Aktivierung dieses Gens kann über einen enzymatischen Test auch quantifiziert werden, so daß eine Aussage über die Stärke der Interaktion möglich ist. In diesem Enzymtest wird die Umset-

zung eines synthetischen Substrates durch die von *lacZ* kodierte β -Galaktosidase photometrisch gemessen.

Um eine Interaktion zwischen Efg1p und Tpk1p bzw. Tpk2p nachzuweisen, wurde die kodierende Sequenz dieser Proteine in Zwei-Hybrid-Vektoren sowohl als Fusion mit der Bindedomäne als auch mit der Aktivierungsdomäne kloniert. Zusätzlich wurde die T206A-Variante von Efg1p für die Zwei-Hybrid-Versuche herangezogen, da nicht auszuschließen ist, daß aufgrund der kurzen Dauer der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A ein Interaktionsnachweis nicht möglich ist. Da T206A an der potentiellen Zielsequenz der PKA nicht phosphoryliert werden kann, bietet dieses Efg1-Derivat die Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen. Eine weitere Schwierigkeit für das Arbeiten mit katalytischen Untereinheiten der PKA stellt die Inaktivierung durch die regulatorische Untereinheit dar. Um diesen Umstand auszuschließen, wurde dem Medium Dibutyryl-cAMP (ein membrangängiger Abkömmling von cAMP) zugesetzt. In einem anderen Ansatz wurde das Zwei-Hybrid-System in einer *pde2*-Mutante getestet. Dieser Stamm besitzt keine Phosphodiesterase mehr und weist daher einen höheren intrazellulären cAMP-Spiegel auf (J. Heitman, pers. Mitteilung). Als Positivkontrolle dienten Transformanten, die Gal4p exprimierten, als Negativkontrolle wurden die Fusionsproteine zusammen mit der unfusionierten Binde- bzw. Aktivierungsdomäne exprimiert, oder die unfusionierte Bindedomäne mit der unfusionierten Aktivierungsdomäne.

In keinem der untersuchten Fälle gelang es, eine Interaktion zwischen der Proteinkinase A und Efg1p nachzuweisen, da weder die Fähigkeit zum Wachstum ohne Histidin und Adenin noch die β -Galaktosidaseaktivität signifikant von der Negativkontrolle abwichen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.4.2 Koimmunopräzipitation von *Efg1* und *Tpk1/2p*

Eine anderes biochemisches Verfahren zum Nachweis von Proteininteraktionen wurde mit der Koimmunopräzipitation von Efg1p und Tpk1p bzw. Tpk2p angewendet. Hierbei wurden ein mit dem HA-Epitop fusioniertes Efg1p und mit einem 6xHis-Epitop fusionierte Varianten von Tpk1p und Tpk2p verwendet. Nach der Überexpression der entsprechenden Plasmide im *C. albicans*-Stamm CA18 wurde Efg1p über Protein-G-Agarose und Anti-HA-Antikörper aus dem Proteinrohextrakt aufgereinigt. Anschließend wurde der aufgereinigte Rohextrakt im Western-Blot analysiert. Dabei wurde nicht nur mit Anti-HA-Antikörpern detektiert, sondern auch mit Anti-His-Antikörpern. Im Falle einer Interaktion des HA-markierten Efg1p mit einer der His-markierten Tpk-Isoformen sollte es also möglich sein, im Western-Blot beide Interaktionspartner über die entsprechenden Antikörper nachzuweisen. Obwohl es stets gelang, das aufgereinigte Efg1p über Anti-HA-Antikörper zu detektieren, ergab sich in keinem Fall ein Signal für eine Tpk-Isoform (Daten nicht gezeigt). Um die bereits für die Zwei-Hybrid-Analyse beschriebenen Probleme als Ursache für den nicht erbringbaren Nachweis der Interaktion auszuschließen, wurde das Verfahren in mehrerer Hinsicht modifiziert.

- Durch Verwendung von cAMP im Aufschlußpuffer sollte die Inaktivierung der Tpk-Isoformen durch die regulatorische Untereinheit aufgehoben werden.
- Eine nicht dissoziierbare Form von ATP (ATP- γ -S) wurde eingesetzt, um die Interaktion zwischen Tpk1p oder Tpk2p und Efg1p im Stadium der Phosphatübertragung „einzufrieren“.
- Durch Zugabe des chemischen „Crosslinkers“ DTSP sollte eine mögliche Interaktion stabilisiert werden. Diese Substanz bindet bivalent an primäre Amine und ist so in Lage, als kovalent gebundene Brücke zwischen zwei interagierenden Proteinen zu fungieren.

Mit keinem dieser Ansätze konnten jedoch Hinweise auf eine Interaktion von Efg1p mit Tpk1p oder Tpk2p gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen des Nachweises der biochemischen Interaktion von Efg1p und Tpk1p oder Tpk2p wurde auch untersucht, ob die Efg1p-Expression in *tpk*-Deletionsstämmen einen Einfluß auf das Laufverhalten von Efg1p im SDS-Polyacrylamidgel hat. Die Laufhöhe der Efg1p-Signale in *tpk*-Deletionsstämmen unterschied sich jedoch nicht von den Verhältnissen im Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Lokalisation von Efg1p

Die Lokalisation eines Proteins ist entscheidend für die Ausübung seiner zellulären Aufgaben. Dabei ist es nicht nur wichtig, daß ein Protein seinen Bestimmungsort erreicht; vielfach wird durch die Steuerung der Lokalisation auch eine regulatorische Wirkung auf das entsprechende Protein ausgeübt.

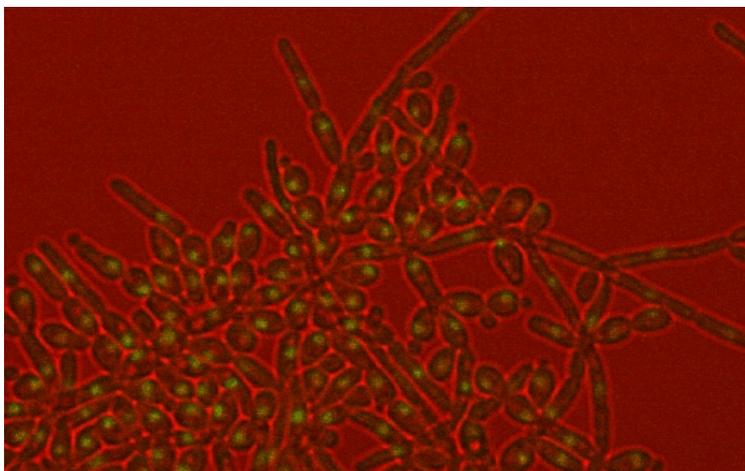


Abb. 3.27: Nachweis der Lokalisation von Efg1p

Zellen des Stammes CA14 wurden mit dem Vektor pDB40 transformiert und über Nacht in 2% CASA angezogen. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme erfolgte durch ein konfokales Lasermikroskop (Leitz). Zu sehen ist die elektronische Überlagerung des Durchlichtbildes und des grünen Fluoreszenzsignals.

Um diese Vorgänge für Efg1p untersuchen zu können, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die zelluläre Lokalisation von Efg1p bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor konstruiert, der für ein Fusionsprotein aus Efg1p und GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) kodiert. Da aufgrund des atypischen Kodongebrauchs von *C. albicans* die Verwendung von GFP aus *Aequorea victoria* nicht möglich ist, wurde auf eine für *C. albicans* kodonoptimierte Form von GFP zurückgegriffen (Cormack *et al.*, 1997). Der konstruierte Vektor erlaubte es, ein C-terminal an *EFG1* fusioniertes GFP unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors zu exprimieren.

Mithilfe dieses Konstruktes gelang es, die Lokalisation der Efg1-GFP-Fusion bei Überexpression durch den *PCK1*-Promotor zu bestimmen (Abb. 3.27). Dazu wurden Zellen des Stammes CA14 mit dem Vektor pDB40 transformiert und über Nacht in Medium mit 2% Casaminsäuren angezogen. Die fotografische Dokumentation erfolgte unter Verwendung eines konfokalen Lasermikroskops. Diese Technik erlaubt nur die Verwendung bestimmter Wellenlängen bei der Fluoreszenzmikroskopie. Aus diesem Grund mußte auf die Anfärbung des Kerns durch DAPI verzichtet werden. Dennoch läßt sich aus Abb. 3.27 eindeutig erkennen, daß in pseudohyphalen Zellen das Fluoreszenzsignal der Efg1-GFP-Fusion im Kern der Zellen lokalisiert ist. Allerdings war das schwache GFP-Signal nur bei starker Überexpression überhaupt nachweisbar. Bei Verwendung von Medien, in denen der *PCK1*-Promotor nicht vollständig induziert ist, war kein Signal sichtbar (nicht gezeigt).

Zur Feststellung der Lokalisation von Efg1-Varianten wurden GFP-Fusionen der Efg-Derivate T206A, T206E und T248E konstruiert und im Stamm CAI4 exprimiert. Keine der Transformanten zeigte jedoch ein Fluoreszenzsignal aufgrund der Expression der Efg1-Varianten. Auch der Versuch, die Lokalisation von T206A, T206E und T248E mittels Immunfluoreszenz zu bestimmen, führte nicht zum Erfolg.

3.2.4 Einfluß von *EFG1* auf die Uridinaufnahme

Neben vielen anderen Virulenzfaktoren von *C. albicans* spielt auch die Fähigkeit des Pilzes zur Synthese von Pyrimidinbasen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, daß Stämme, in denen beide Kopien des *URA3*-Gens disruptiert wurden, eine stark verminderte Virulenz im

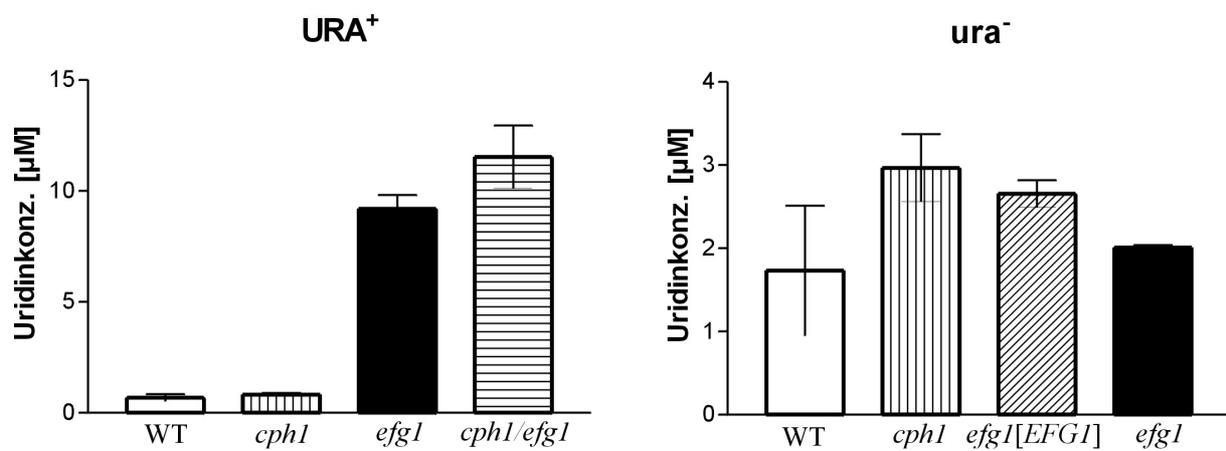


Abb. 3.28: Uridinaufnahme in *efg1*-Deletionsstämmen

Die angegebenen Stämme wurden über Nacht in SD (A) oder SD+Uridin (B) angezogen und die Aufnahme von radioaktiv markiertem ^3H -Uridin in einem Zeitraum von 30 sek bestimmt: **links:** SC5314 (WT); JKC19 (*cph1*), HLC52 (*efg1*), HLC54 (*efg1 cph1*); **rechts:** CAI4 (WT), JKC18 (*cph1*), HLC74 (*efg1[EFG1]*), HLC67 (*efg1*).

Mausmodell zeigen (Kirsch und Whitney, 1991). *URA3* kodiert für eine Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase, die die Umsetzung von Orotidin-5'-Monophosphat zu Uridin-5'-Monophosphat katalysiert. Da auch die Deletion von *EFG1* die Virulenz beeinflusst, und das *DUT1*-Gen, das für den dUTP-Transport wichtig ist, eine mögliche Bindestelle für eine Regulation durch Efg1p besitzt (T. Doedt, pers. Mitteilung), erschien es sinnvoll, den Einfluß von *efg1*-Deletionen auf den Uridintransport zu untersuchen. Dazu wurde die Aufnahmerate von radioaktiv markiertem ^3H -Uridin in Abhängigkeit von der *EFG1*-Expression in verschiedenen Stämmen bestimmt (Abb. 3.28). Dabei zeigte sich, daß die Uridinaufnahmegeschwindigkeit im Uridin-prototrophen *efg1*-Deletionsstamm HLC52 etwa um das Zehnfache höher lag als im Wildtyp (Abb. 3.28 links). Dieser Effekt kann als spezifisch für *EFG1* angesehen werden, da eine Deletion von *CPH1* keinen Einfluß auf die Uridinkonzentration in der Zelle hatte. Auch die zusätzliche Deletion von *CPH1* in einer *efg1*-Nullmutante (Stamm HLC54) hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Aufnahmerate.

Hingegen waren die Verhältnisse in Uridinauxotrophen Stämmen anders. Diese wurden vor der Durchführung der Aufnahmemessung in Medium angezogen, dem Uridin zugesetzt wurde. Hier unterschied sich die Uridinaufnahme in dem *efg1*-Deletionsstamm HLC67 nicht signifikant von den in den Vergleichsstämmen CAI4 (WT), JKC18 (*cph1/cph1*) oder HLC74 (*efg1/efg1 [EFG1]*) gemessenen Werten (Abb. 2.25 B).

Um den Einfluß der *EFG1*-Expression auf die Uridinaufnahme näher bestimmen zu können, wurden zusätzliche Messungen im Stamm HLC67 durchgeführt (Abb 3.29). Nach der Transformation der Vektoren pRC2312 als *EFG1*-Negativkontrolle in CAI4 und HLC67 sowie der Vektoren pDB1 (Expression der T206A-Variante von *Efg1p*) und pBI-HAHD (*EFG1*) wurden die Zellen in Minimalmedium angezogen und anschließend die Uridinaufnahmerate bestimmt. Dabei erwies sich, daß ohne *EFG1*-Expression die Rate im Vergleich zum Wildtyp wiederum stark erhöht war. Der gleiche Effekt zeigte sich bei der Expression der T206A-Variante von *Efg1p*. Wurde die *efg1*-Deletion durch Expression des *EFG1*-Gens komplementiert, ergab sich wieder eine Uridinaufnahmerate im Bereich des Wertes für den Wildtypstamm CAI4.

Abschließend wurde überprüft, ob die durch die fehlende *EFG1*-Expression erzielte Wirkung auf eine spezifische Erhöhung des Uridintransportes zurückzuführen ist, oder ob allgemeine Effekte, wie eine Permeabilisierung der Membran für dieses Phänomen verantwortlich zu machen sind. Dazu wurde in den uridinprototrophen Stämmen SC5314 (WT), JKC19 (*cph1/cph1*), HLC52 (*efg1/efg1*) und HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) die Glukoseaufnahme gemessen. Diese Messungen wurden analog zu den Uridinaufnahmebestimmungen durchgeführt; allerdings wurde ^{14}C -markierte Glukose verwendet und über 10 statt 30 sek gemessen.

Die in Abb. 3.30 erfaßten Meßwerte zeigten eine etwas geringere intrazelluläre Glukosekonzentration bei allen getesteten Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings läßt sich für die Glukoseaufnahme keine Abhängigkeit von der *EFG1*-Expression feststellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die fehlende Expression von *EFG1* spezifisch die Rate der Uridinaufnahme steigert. Dieser Effekt läßt sich durch die episomale *EFG1*-Expression, nicht jedoch durch die Expression der T206A-Variante unterdrücken. Dabei zeigt sich keine Änderung der Uridinaufnahme, wenn die getesteten Zellen zuvor in uridinhaltigem Medium angezogen wurden. Die Tatsache, daß die Glukoseaufnahme nicht durch *EFG1* beeinflusst wird, läßt dabei auf einen Uridin-spezifischen Mechanismus schließen.

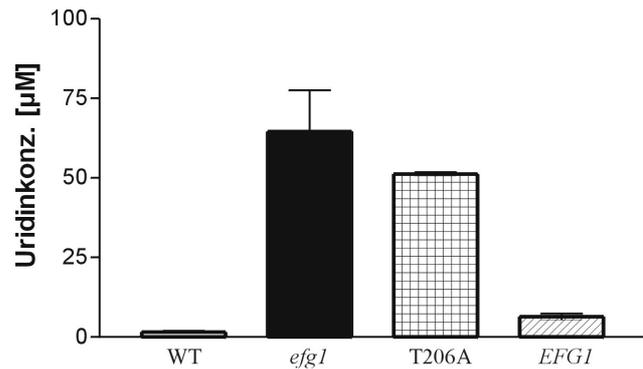


Abb 3.29: *EFG1*-abhängige Uridinaufnahme

Zellen des *efg1*-Deletionsstammes HLC67 wurden mit den Plasmiden pRC2312 (*efg1*), pDB1 (T206A) und pBI-HAHD (*EFG1*) transformiert und die intrazelluläre Konzentration an ^3H -Uridin nach 30 sek Aufnahme in Doppelproben gemessen. Als Wildtypkontrolle dienten mit pRC2312 transformierte CAI4-Zellen (WT).

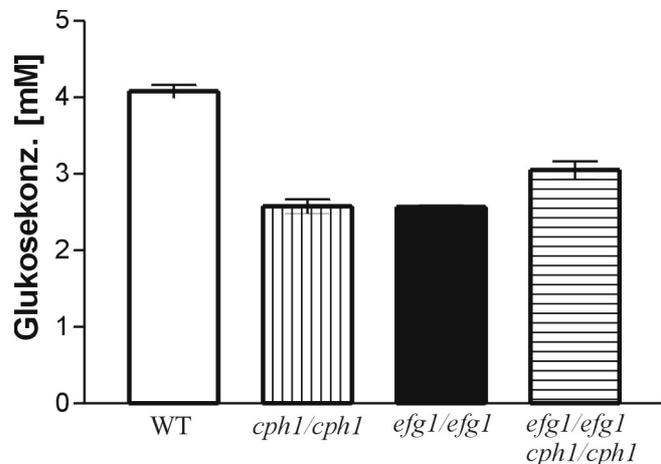


Abb 3.30: Messung der Glukoseaufnahme

Die Stämme SC5314 (WT), JKC19 (*cph1/cph1*), HLC52 (*efg1/efg1*) und HLC54 (*efg1/efg1 cph1/cph1*) wurden über Nacht in Minimalmedium angezogen und anschließend mithilfe von ^{14}C -markierter Glukose in Doppelbestimmung die Aufnahme über 10 sek ermittelt.

3.3 Identifikation des Efg1p-Homologs Efh1p

Morphogenetische Prozesse werden in Pilzen unter anderem durch Proteine reguliert, die zur sogenannten APSES-Familie gehören. Diese Bezeichnung leitet sich aus den Anfangsbuchstaben der zuerst identifizierten Mitglieder dieser Gruppe her, deren gemeinsames Merkmal ein außerordentlich hoch konservierter Bereich um eine bHLH-Domäne ist. Es sind dies Asm1p aus *Neurospora crassa*, Phd1p und Sok2p aus *S. cerevisiae*, Efg1p aus *C. albicans* und StuAp aus *Aspergillus nidulans*. Beide Homologe aus *S. cerevisiae* sind in die Steuerung der Pseudohyphenbildung involviert, wobei über den genauen Mechanismus ihrer Regulation noch nicht viel bekannt ist. Sicher ist, daß Phd1p die Bildung von Pseudohyphen fördert, während Sok2p sie hemmt (Ward *et al.*, 1995; Gimeno und Fink, 1994). Dabei scheint die Bedeutung von Phd1p als Regulator filamentösen Wachstums in *S. cerevisiae* nicht zwangsläufig mit der von Efg1p in *C. albicans* vergleichbar zu sein, obschon beide eine ähnliche regulatorische Funktion zu haben scheinen. So zieht die Disruption von *PHD1* nur einen sehr geringen Defekt in der Pseudohyphenbildung nach sich, während *efg1*-Nullmutanten unter den meisten Bedingungen afilementös sind (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Besonders interessant ist jedoch das Vorkommen von zwei APSES-Proteinen mit antagonistischem Charakter in einer Spezies. Da bHLH-Proteine häufig Dimere bilden, ist es denkbar, daß auch Phd1p und Sok2p durch eine Dimerisierung, untereinander oder mit anderen Partnern, ihre spezifischen Funktionen wahrnehmen. Dabei können durch unterschiedliche Partnerwahl auch die Aufgaben eines bHLH-Proteins ambivalent sein. So aktiviert das aus Säugerzellen bekannte bHLH-Protein Myc einerseits das Zellwachstum, hemmt aber – vermutlich als Repressor der Transkription – die Zelldifferenzierung (Li *et al.*, 1994).

Unter diesem Gesichtspunkt stellt sich die Frage, wie Efg1p in *C. albicans* als Regulator der Morphogenese wirkt. Immerhin führen sowohl Überexpression als auch Deletion von *EFG1* zur Ausbildung pseudohyphaler Strukturen, wenngleich die Morphologie der beiden Filamenttypen stark voneinander abweicht. Die Identifikation des *EFHI*-Gens aus *C. albicans*, das für ein neues Mitglied der APSES-Proteinfamilie kodiert, könnte weitere Aufschlüsse über das Zusammenspiel der Proteine dieser Gruppe von bHLH-Proteinen bei der Steuerung filamentösen Wachstums bringen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die komplette Basensequenz von *EFHI* aufzuklären und das Gen in *C. albicans*-Vektoren zu exprimieren. Darüberhinaus werden erste Ergebnisse vorgestellt, die auf eine Mitwirkung von Efh1p bei der Regulation der Morphogenese von *C. albicans* hindeuten.

3.3.1 Aufklärung der Basensequenz von *EFHI*

Mithilfe von Sequenzen aus dem *C. albicans*-Sequenzierprojekt (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) konnten durch Datenbankvergleiche Teile eines offenen Leserasters identifiziert werden, die für Peptidsequenzen kodieren, welche große Homologien zur APSES-Domäne aus Efg1p aufweisen. Aufgrund von Sequenzierfehlern war es nötig, die entsprechende Region nochmals zu sequenzieren, um die genaue Ausdehnung des offenen Leserahmens lokalisieren zu können. Zu diesem Zweck wurden drei Oligonukleotide (AN1-3) angefertigt, die der Klonierung und Sequenzierung des *EFHI*-Gens dienen sollten. Der Name *EFHI* wurde wegen der Homologie zu *EFG1* gewählt (*EFG1*-Homolog). Aus den zugänglichen Sequenzdaten ergaben sich zwei mögliche Startkodons für den offenen Leserahmen von *EFHI*. An diesen Punkten setzen die Oligonukleotide AN1 und AN2 an, die für eine Klonierung des Gens mit *Bam*HI-Schnittstellen versehen wurden. AN3 setzt am vermutlichen Stopkodon an.

—————▶

1 **ATGAATGGTA TTATGACGAC** ATCGAGTCAT TCAAACCTTT ATAATCAGGA TTTAGTTGGG GCACCATCAA
71 GCTCAGATCA CATTCCTGGT CCTTCATCTC AGGACCAACC CACTAATAAT AATTCTCCTC AACATCACCA
141 TCAGCATGAC CAATCTCAA CCACTCATCA AAACCACCCA TTAAACCAAC CCATTCACCA CCATCCTACT
211 CAGCAAAATC AGCTGGAGTC ACAACAGTCA AGACAATCAC ATCATTTGCA GCAACAGCAA CAACAACAAC
281 AACAGCAGCA GCAGAATCAA CATAACCAAC AAAACTTAGC TTCATCTTCT ACAAGTTATG AAATGCCTTC
351 GATATATCAA CAATTTACAG GCTCTTACCA ACAAACACGA GTACCAAAGA ACTTTCTATT GGAAAATGCA
421 AACTACTACA CATTACAACC AGGATTTCTT CTTGTTTCCAG CAGCTGATTA TTATAGTACT CCAACAACCA
491 CCTCTGCCAA TGATTATCAA AACTCGACGA TAAATCTGAT AATTAGCCCA TCATTCCAAA TGGGTTTCACT
561 TTCAACACCT GATACTCAA ATTCAAGCAT TCGGAGCAAG CAACAACAGC AACACTCATA TCAGCAACAA
631 CAACCACAGC **AGTTGCTGCA ATCAGCAT** CAACTGCAAG TTCCAGATAT ATTTTATACT CAAGGCGGTA
701 CAATTGGAGG **TTATGTCACG ACAAACAAC** AACAAAAAGA GTTTTCAAGA AAAACCAGTG GAGATCAAAC
771 ACTTGTCC CAAACCAATT CTAAATTACA ACAACAAATT TCGGAGACTT CATATCTGCA GCAGCAGCAG
841 CAACAACAAT CACCACCAAC ACCTCAAAA CAGCAGCAAC AGCAACATTA TCAGCATCAA ACAACTCAAC
911 CTTATGGTGG TACAGGCTTT ATGTTGTATT CTCAAACCTGG AGGTCCATCT TCATCACCAG TGGCTGGTAA
981 TATCTCAATA CCAACAACGA TTGCTACTAC TGGTCAGCCA AATTCTCAGT TTCAGTTCAC TTATGGATCG
1051 CCTCAACAAG GATCTTCATC AAAAATAAT CAAATGTATT TATATCAAAG ACAGCAGCAA CAACAGCAAC
1121 AGCATCAACA ACCGCAATCA CAACAAATGT CTCAAATATC ACAATTGTCT CAACAAATAC CACCTCAAGG
1191 TTCAGTAAA AATATCTGA TCAATTCCAC TCCGACAAAA TCAAGAGCGT CATCAATCAC CACCCGTAGT
1261 GGACGTCAAT CCAGATCTAC TTCAATCAGT AGTTTTATAC CTCAACCTGA TTACCCAGAA CGTGTAATTC
1331 GACCAAAAGT TGCCACAACA AGATGGGATG ATGAAATAC CAATTGTTAT CAAGTTCGAG CACGAAATAT
1401 TTTAGTTTCT CGTCGTGAAG ATACCAATTA TATTAATGGC ACAAATTAT TGAATGTCAT TGGTATGACA
1471 CGAGGTAAAC GAGATGGAAT ACTAAAGACG GAAAAGATTA AAAATGTGGT TAAAGTTGGA TCAATGAATT
1541 TGAAGGGGGT TTGGATTCTT TTTGATCGAG CATATGAAAT TGCTAGAAAT GAAGGTGTTG ATAGTTTATT
1611 ATACCCTTTA TTTGTCAAAA ATATAAGCA ATACTTTTTA ACCAAGGGTC ACAAATTGAA GAGTGAAGAT
1681 GACGAGCAAG AGATTTTAGA AGAAGGTATG ACAAGACAAA GAGAAGAAGT AAGGAGAGAA GGAAGGTCAA
1751 ATGGGGTTGG TGATTTCCAC AATGAAGAAG AAGAAGAGAT TGTGGGAATA CAAGAAGATG CAGGTCCCTAA
1821 CACTGCTGAA AATGATGTTT CTGGCGATGA CGAAGAAGAA GAAGACGACG ATGATGATGA TGATGATGAC
1891 GAGGAAGAAG GCGAACAAGA TGACGAAGAA GAAGAGGATG GGTCTTCAAC TTCGATGTCA AGTAGTAAGA
1961 ATTCAGAATC CAAATTATTG GAAACACGTG ACGTGATTAA AAGTATTGTT GAAGAAGGTG ATTCAACTAC
2031 AGGTAATGTT TCAGAAGTTA AATATGTTCA TGAATATCTT GAAAGATCTC CACAATCAAC TGCCATAAAG
2101 GAAGAAGACC TTTACTATGG TTCATCTCAT AATACACCTC TAACTGTTCA **CAAAACATTA TGATAA**

◀—————

Abb. 3.31: Korrigierte Basensequenz von *EFH1*

Mithilfe der Oligonukleotide AN1 und AN3 bzw. AN2 und AN3 wurden zwei mögliche offene Leseraster des *EFH1*-Gens aus genomischer DNA des Stammes SC5314 amplifiziert und in den Vektor pUC18 kloniert. Die Aufklärung dieser Sequenzen erfolgte in Auftragsarbeit durch die Firma SeqLab, Göttingen. Die Sequenzen der Oligonukleotide AN1 (oben), AN2 (mitte) und AN3 (unten; Komplementärsequenz ist dargestellt) sind fett gedruckt; Die Pfeilrichtung gibt die 5'-3'-Orientierung der Oligonukleotide an.

Aus genomischer DNA des Stammes SC5314 wurden unter Verwendung der Oligonukleotide AN1 und AN3 bzw. AN2 und AN3 zwei Fragmente amplifiziert und in den bakteriellen Vektor pUC18 kloniert, was zum Erhalt der Plasmide pDB30 und pDB31 führte. Anschließend wurde die Sequenz dieser beiden Fragmente durch die Firma SeqLab (Göttingen) in

Auftragsarbeit bestimmt. Dadurch ergab sich die in Abb. 3.31 gezeigte berichtigte Basensequenz von *EFH1*, in der nun die Bindestelle von AN1 als Startpunkt des offenen Leserahmens festgelegt werden konnte. Das *EFH1*-Gen umfaßt somit 2160 bp und kodiert für ein Protein von 720 AS.

3.3.2 Homologievergleiche von Efh1p und Efg1p

Um Efh1p als Mitglied der APSES-Proteinfamilie zu identifizieren, wurden Homologievergleiche der Efh1p-Gesamtsequenz zu Efg1p sowie der putativen APSES-Domäne von Efh1p zu denen der bekannten APSES-Proteinen durchgeführt.

Aus dem in Abb. 3.32 dargestellten Clustalx-Vergleich der Proteinsequenzen von Efh1p und Efg1p ist ersichtlich, daß außerhalb der APSES-Domäne (Bei Efh1p etwa von Position 400-500) keine signifikante Homologie zwischen den beiden Proteinen erkennbar ist.

```

Efh1p : NSPQHHHQHDQSQTTHQNHPNLPQIHHHPTQONQLESQOSRQSHHLQQQQQQQQQQONQHNQONLASSSTSYEMPSTIYQ : 80
Efg1p : -----MSTYSIP-YYN : 10

Efh1p : QFTGSYQOTRVPKNFLEENANYITLQPGFPLVQAADYYSTPTTTSANDYQNSTINLIISPSFQMGVSVPDTONSSIRSK : 160
Efg1p : CMNGNYNNG-MPQQTAAANQQAQFQQ-----Q-----QPTTTGN-----ASQQQQQAAATA : 55

Efh1p : QQQQHSYQQQQPQQLLSQHQQLQVPIIFYTQGGTTCGYVTTKQQQKEFSRKTSGDQTLVPQTNSKLLQQQISETSYLQQQQ : 240
Efg1p : AAVQQFYNY-----MFYQQQGPC-----QQTG : 78

Efh1p : QQQSPETPKQQQQQHYQHQTTPYGGTGFMLYSQTGGPSSSPVAGNISITPTTIATGQOPNSQFQFTYGSBQQGSSSKTN : 320
Efg1p : -QTAGQQQQQQQQQCYDYNINRY---QMPAATSQGNYYQOTIIPNQLSQPQPHYNGSNRNYTSAPSGAPIPSNSTSG- : 153

Efh1p : QMYLYQRQQQQQQHQPOQSOQMSQISQLSQCTPPOGSSKNILINSTPTTKSRASSITTRSGRQSRSTSTSSFTIPQDPYPE : 400
Efg1p : -----PSQQPPLPGQAVFIPPHVST---MQQPTPVQDTLN-----ASSTSTVGOFPQPPG : 200

Efh1p : RVIIRPKVATIRWDDENTINCYQVRARNILVSRREDINYNINGTKLLNVIQMTGRKRDGILKTEKIKNVVKVGSMLKGVWIP : 480
Efg1p : --IRPRVTTTWEDKTLQYQVDANNVSVVRRADNMININGTKLLNVAQMTGRGRDGLKSEKVRHVVKIGSMELKGVWIP : 278

Efh1p : FDRAYEITARNEGVDSLLYPLFVKNIKQYFLT-----KGHKLKSEDDQEIEEGMTRQREEVREGRSNG : 545
Efg1p : FERALAMAQRQIIVDMLYPLFVRDIKRVIQTGVTPNAAAAATAAAATATSASAPPPPPPVAATTTAATAISKSSSNG : 358

Efh1p : VGDFHNEEEEEIVGIQEDAGPNTAEN-----DVPGDDEEEEDDDDDDDDEEAGE : 595
Efg1p : NSISATSGGSNVSGASGAGSTTSPVNTKAATAAGIQGNYYQTYNQOYPOQYGOYNAPGKNQNTPSQPGSTTNDQYLQ : 438

Efh1p : QDEEEEE-----DGSSTSMSSSKNSESKLLETRDVIKSIIVEEGDSTTGNVSEVKYVHEYTE : 651
Efg1p : QQQQQQQQMYGYQLNYYQGGAAANSYYPNYYQQQQPNYASSYPYQQQQKQQQQPNQQQSDQQQTSTPFGGAGTRSVH : 518

Efh1p : RSPQSTAIKEEDLYYGSSHNTPLTVHKTL---- : 680
Efg1p : QSPQVQSLTQGSVHPSQQQHQANQSASTVAKEEK : 552

```

Abb 3.32: Clustalx-Vergleich von Efh1p mit Efg1p

Die Grafik beinhaltet den Vergleich einer 680 AS umfassenden Teilsequenz von Efh1p mit der Gesamtsequenz von Efg1p. Homologe Bereiche sind dunkel dargestellt. Die APSES-Domäne findet sich als konservierte Region in Reihe 6 und 7.

Als weiteres verbindendes Element ist lediglich das Auftreten von glutaminreichen Regionen zu nennen, wie sie für Transkriptionsfaktoren typisch sind. Diese glutaminreichen Regionen sind bei Efh1p besonders N-terminal der APSES-Domäne ausgeprägt, während sie bei Efg1p auch am C-Terminus zu finden sind.

Vergleicht man die APSES-Domäne von Efh1p mit denen der anderen bekannten Mitglieder dieser Gruppe von Proteinen, so stellt man fest, daß Efh1p die gleichen konservierten Regionen aufweist, die auch die anderen APSES-Proteine auszeichnet (Abb. 3.33). Es ist deshalb als sicher zu bezeichnen, daß mit Efh1p das „fehlende“ APSES-Protein aus *C. albicans* gefunden werden konnte, wenn man davon ausgeht, daß aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *S. cerevisiae* das Vorhandensein zweier Homologe zu Phd1p und Sok2p zu erwarten war.

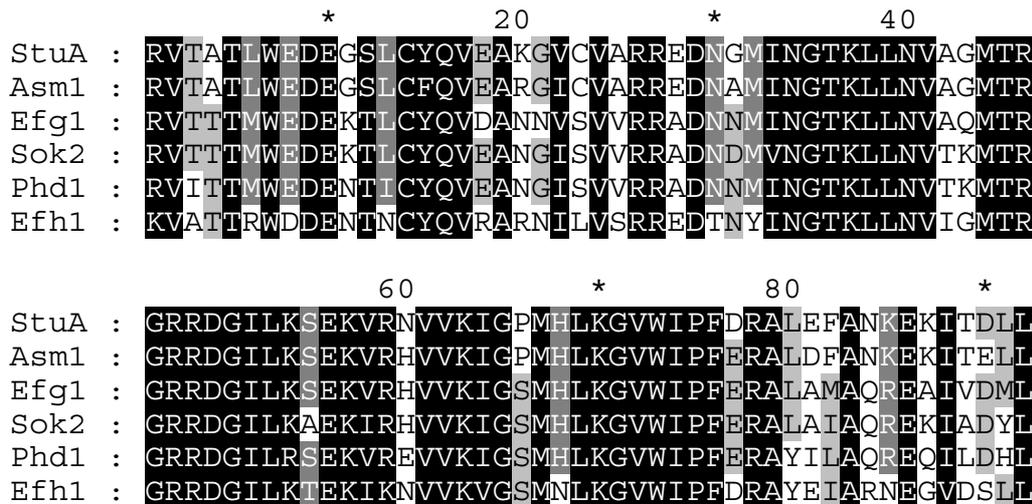


Abb. 3.33: Vergleich der APSES-Domänen aus Proteinen verschiedener Pilzarten

Dennoch existieren einige Besonderheiten, die für die Efh1p-spezifischen Funktionen von Bedeutung sein könnten. Interessant ist zunächst, daß die PKA-Phosphorylierungssequenz RVT, für die in Efg1p in Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung an der Hyphenbildung nachgewiesen werden konnte, in Efh1p nicht existiert. Das Threonin ist hier durch eine aliphatische Aminosäure ersetzt, wie es auch bei Phd1p der Fall ist. Ebenso ist das in Abb. 3.33 an Position 80 abgebildete Tyrosin nur bei Efh1p und Pdh1p zu finden, während sich bei den anderen APSES-Proteinen an dieser Stelle ein Leucin befindet. Als *C. albicans*-Spezifikum ist das an Position 21 abgebildete Asparagin bei Efg1p und Efh1p zu betrachten, das bei den anderen APSES-Proteinen als Glycin konserviert ist. Auf die mögliche Bedeutung dieser und weiterer Besonderheiten wird in der Diskussion noch ausführlicher eingegangen.

3.3.3 Überexpression von *EFH1*

Da die Überexpression von *EFG1* bereits einen Hinweis auf die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors bei der Regulation des filamentösen Wachstum bietet, sollte untersucht werden, ob auch die Überexpression von *EFH1* die Morphologie von *C. albicans* beeinflusst.

Zu diesem Zweck wurde ein *C. albicans*-Expressionsvektor konstruiert, in dem *EFH1* unter der Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors steht. Durch Anziehen der mit diesem Vektor transformierten Zellen in Minimalmedium mit 2% Casaminsäuren als einziger Kohlenstoffquelle wird der *PCK1*-Promotor voll induziert und ein etwaiger Überexpressionsphänotyp sichtbar.

Wie Abb. 3.34 verdeutlicht, bewirkte die Überexpression von *EFH1* einen ähnlichen Phänotyp wie die *EFG1*-Überexpression. In beiden Fällen wurden Pseudohyphen ausgebildet, die den charakteristischen *EFG1*-Überexpressionsphänotyp wiedergaben, bei dem die einzelnen Zellen einer pseudohyphalen Kette stark elongiert sind.

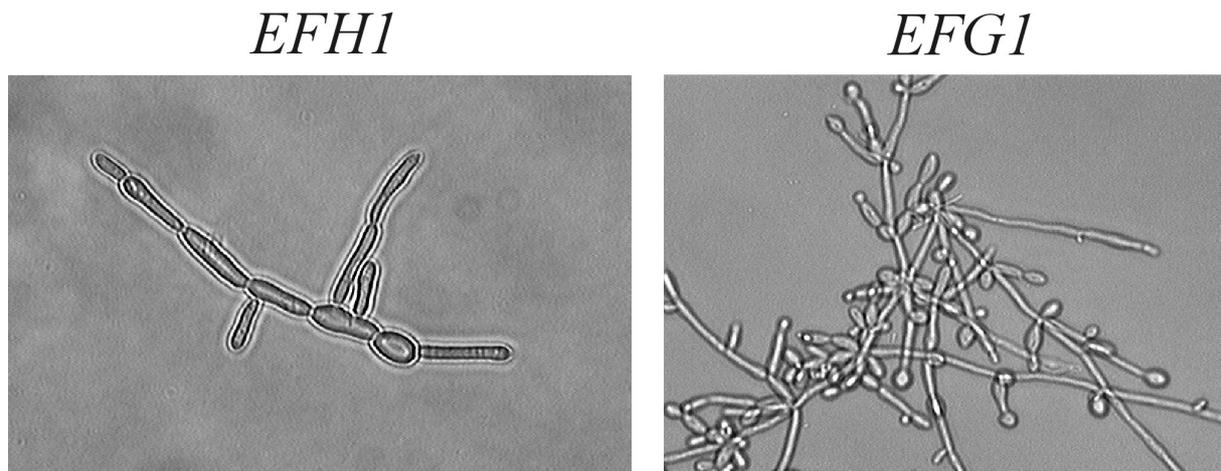


Abb. 3.34: Überexpressionsphänotypen von *EFH1* und *EFG1*
 Zellen des Stammes CA14 wurden mit den Plasmiden pDB40 (*EFH1*) und pBI-HAHYD (*EFG1*) transformiert und in Medium mit 2% CASA über Nacht angezogen.

3.3.4 Zwei-Hybrid-Analyse von Efh1p

Da bHLH-Proteine ihre zellulären Aufgaben meist in Form von Dimeren ausüben, sollte die Frage geklärt werden, ob Efh1p mit Efg1p interagiert. Zum Nachweis dieser Interaktion wurde die Zwei-Hybrid-Analyse gewählt, die mit Fusionsproteinen von Efg1p bzw. Efh1p und der Aktivierungs- bzw. Bindedomäne von Gal4p durchgeführt wurde.

Die verwendete Methode nach James *et al.* (1996) erlaubt eine Beurteilung der Interaktionsstärke über verschiedene Reportergene. Neben der Messung der β -Galaktosidaseaktivität kann dabei auf Wachstum auf Medium ohne Histidin bzw. Adenin selektioniert werden. Dabei werden durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren die einzelnen Reportergene in unterschiedlicher Weise durch ein mögliches interaktionsbedingtes Dimer aktiviert, so daß eine unabhängige Bewertung der Interaktion durch drei verschiedene Reportersysteme möglich ist (James *et al.*, 1996).

Im Falle der Untersuchung bezüglich einer Interaktion zwischen Efg1p und Efh1p zeigte sich, daß bereits die Fusion von Efh1p an die Gal4p-Bindedomäne eine Aktivierung des

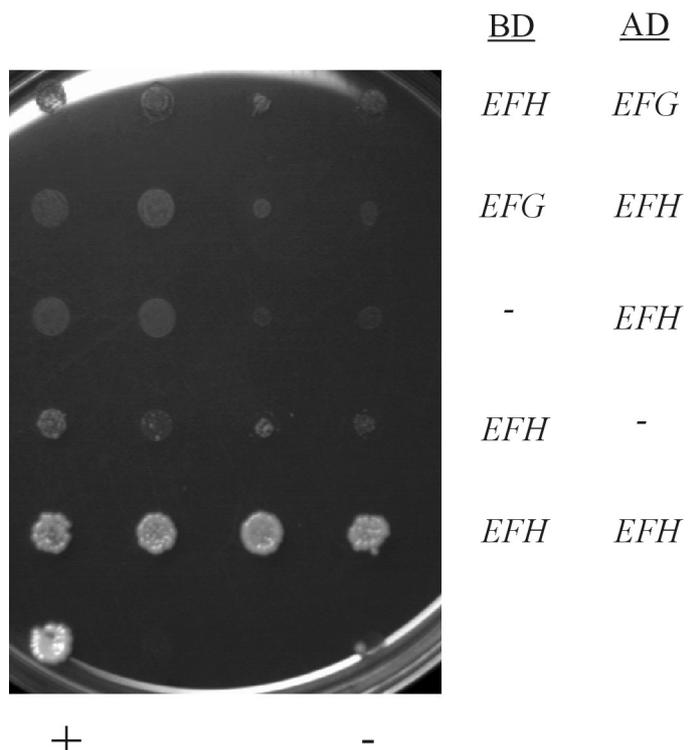


Abb. 3.35: Interaktion zwischen Efh1p und Efg1p
 Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes pJ69-4A wurden mit je zwei der Vektoren pDB16 (AD-EFG1), pDB17 (BD-EFG1), pDB33 (AD-EFH1), pDB34 (BD-EFH1), pGAD-C1 (nur AD) und pGBD-C1 (nur BD) in der angegebenen Kombination transformiert und vier unabhängige Transformanten auf Medium ohne Adenin angezogen. Als Positivkontrolle (+) diente eine Gal4p-Expression, als Negativkontrolle (-) die Expression von unfusionierter Aktivierungs- und Bindedomäne.

AD=Aktivierungsdomäne; BD=Bindedomäne

lacZ- und des *HIS3*-Reportergens zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion mit Efg1p oder einem weiteren Efh1p konnte über diese Reportergene nicht gezeigt werden. Die Selektion auf Medium ohne Adenin ergab hingegen eine stärkere Aktivierung des *ADE2*-Gens durch eine Homodimerbildung von Efh1p (Abb 3.35). Während die gemeinsame Expression von Efg1p- und Efh1p-Fusionsproteinen nicht zu einem Wachstum auf Medium ohne Adenin führte, zeigten Zellen, die Fusionsproteine mit Efh1p an der Aktivierungs- und Bindedomäne durch ihr Wachstum eine Interaktion an. Wie sich außerdem erkennen läßt, bewirkt auch die Expression des Fusionsproteins von Efh1p mit der Bindedomäne ein schwaches Wachstum auf diesem Medium. Mittels der durchgeführten Zwei-Hybrid-Analyse konnte also gezeigt werden, daß Efh1p Homodimere bildet, während eine Interaktion von Efh1p und Efg1p unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.

3.3.5 Suppression von Hyphendefekten durch *EFH1*-Überexpression

Um zu überprüfen, ob Efh1p in ähnlicher Weise wie Efg1p in die bekannten Signalwege zur Hyphenbildung in *C. albicans* involviert ist, wurde *EFH1* in Deletionstämmen überexprimiert, in denen *CEK1*, *CPH1*, *TPK1*, *TPK2* oder *EFG1* disruptiert worden waren. Transformanten dieser Stämme wurden auf Spider-Medium ausplattiert und ihre Hyphenbildung nach drei Tagen bei 37°C protokolliert. Dabei zeigte sich, daß in keinem Fall ein Hyphendefekt durch die Überexpression von *EFH1* komplementiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Um Angriffspunkte für wirksamere Antimykotika zu finden, ist es notwendig, die Virulenzfaktoren von *C. albicans* auf molekularer Ebene zu verstehen. Es ist wahrscheinlich, daß viele Faktoren auf Erreger- und Wirtsseite die Ausbildung einer *Candida*-Infektion beeinflussen (Cutler, 1991). Dabei ist bemerkenswert, daß *C. albicans* als harmloser Kommensale der Darmschleimhaut bei den meisten Menschen allenfalls lokale Infektionen auslöst, während eine Immunsuppression die Ausbildung einer systemischen Candidose begünstigt, die nicht selten tödlich endet.

Neben anderen Faktoren wird vor allem der Wechsel der Morphologie als wichtige Virulenzeigenschaft bei *C. albicans* diskutiert. Bei diesem sogenannten Dimorphismus handelt es sich um die Fähigkeit des Pilzes, zwischen einzelligen und filamentösen Formen zu wechseln. Dabei erlauben es filamentöse Zellformen (die noch einmal aufgrund ihrer unterschiedlichen Bildungsweise in Pseudohyphen und echte Hyphen untergliedert werden) *C. albicans*, sich an Gewebe anzuheften und diese zu penetrieren, um etwa vom Darmlumen in die Blutgefäße zu gelangen. Die Hefeform könnte hingegen einer effizienten Verbreitung des Pilzes über den Blutkreislauf dienen (Calderone und Braun, 1991).

Inzwischen sind viele *C. albicans*-Gene bekannt, die in irgendeiner Weise in die Zellmorphologie eingreifen. Die Analyse dieser Gene wird jedoch durch das diploide Genom von *C. albicans* erschwert, da viele Methoden der klassischen Hefegenetik, wie Kreuzungen oder Tetradenanalysen, bei diesem Organismus keine Anwendung finden. Deshalb wurden bislang häufig die Verhältnisse in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Modell für die Mechanismen in *C. albicans* herangezogen, da *S. cerevisiae* ebenfalls in der Lage ist, filamentös zu wachsen. Allerdings kann die Bäckerhefe keine echten Hyphen ausbilden, die durch das Auswachsen eines Keimschlauches entstehen, sondern bildet lediglich Pseudohyphen in Form von Zellketten, bei denen die einzelnen Zellen mehr oder weniger elongiert werden.

In Kenntnis dieser Zusammenhänge werden in *C. albicans* mindestens zwei Signaltransduktionswege postuliert, die der Regulation dimorphen Wachstums dienen: Eine MAPK-Kaskade, die zu Proteinen Komponenten beinhaltet, die in *S. cerevisiae* die Pseudohyphenbildung steuern, sowie einen cAMP-abhängigen Weg über die Proteinkinase A.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Daten gewonnen, die das Bild der Signaltransduktionswege ergänzen, welche das filamentöse Wachstum in *C. albicans* regulieren. So konnte mit Tpk1p eine weitere katalytische Untereinheit der Proteinkinase A charakterisiert und ihre Beteiligung an der Steuerung der Hyphenbildung gezeigt werden. Darauf basierend wurde außerdem die Regulation des für die Morphogenese essentiellen Transkriptionsfaktors Efg1p untersucht. Die durchgeführten Experimente geben Hinweise auf eine Aktivierung durch die Proteinkinase A, aber auch auf das Vorhandensein weiterer Kinasen, die in die Steuerung der Efg1p-Aktivität involviert sind. Schließlich konnte mit dem zu Efg1p homologen Protein Efh1p ein weiterer potentieller Regulator der Morphogenese von *C. albicans* identifiziert werden, der der Familie der sogenannten APSES-Proteine zuzuordnen ist.

4.1 Charakterisierung von Tpk1p aus *C. albicans*

Obwohl die morphogenetischen Prozesse, die bei verschiedenen Pilzen beobachtet werden können, teilweise stark voneinander abweichen, sind die molekularen Komponenten, die an der Steuerung dieser Prozesse beteiligt sind, im allgemeinen konserviert. Die regulatorische Funktion eines cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges nimmt dabei in vielen der untersuchten Spezies eine zentrale Rolle ein. Allgemeines Prinzip ist die Kontrolle des cAMP-Spiegels durch die cAMP-synthetisierende Adenylylzyklase einerseits und cAMP-abbauende Phosphodiesterasen andererseits. Das Gleichgewicht dieser Enzymaktivitäten wird dabei letztlich durch extrazelluläre Signale bestimmt, die somit die intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflussen. Als Mediatoren der äußeren Signale dienen GTP-bindende (G-) Proteine, die entweder in trimerer Form, oder, wie im Falle des bei Säugern als tumorassoziiertes Protein bekannten G-Proteins Ras.

Ein besonders gut untersuchter cAMP-vermittelter Regulationsmechanismus ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Bei niedrigem cAMP-Spiegel liegt die PKA als inaktives Tetramer, bestehend aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten, vor. Die Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirkt eine Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, indem cAMP an die regulatorischen Untereinheiten bindet und über die durch die Bindung verursachte Konformationsänderung eine Ablösung der katalytischen Untereinheiten vermittelt. Letztere können nun in der losgelösten Form ihre zelluläre Aufgabe ausüben, indem sie Zielproteine phosphorylieren, deren Funktion über die angehängte Phosphatgruppe in verschiedener Weise moduliert wird.

In dem humanpathogenen Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* hat die PKA-Aktivität Einfluß auf Paarung und Virulenz des Pilzes. Interessanterweise ist die Virulenz bei *C. neoformans* an den Paarungstyp gekoppelt, der wie bei *S. cerevisiae* mit a oder α bezeichnet wird. Annähernd alle klinischen Isolate von *C. neoformans* weisen den Paarungstyp α auf (Kwon-Chung und Bennett, 1978). Die Deletion des *GP1*-Gens, das für die cAMP-regulierende α -Untereinheit eines trimeren G-Proteins kodiert, führt ebenso zu einer verminderten Virulenz wie der Verlust von *RAS1* (Alspaugh *et al.*, 1997; Alspaugh *et al.*, 2000).

Auch bei den pflanzenpathogenen Pilzen *Ustilago maydis* und *Magnaporthe grisea* ist die Proteinkinase A in die Kontrolle der Morphogenese involviert. Während bei *M. grisea* die Virulenz aufgrund einer fehlenden Ausbildung von Appressorien durch die Deletion eines Gens für die katalytische Untereinheit der PKA beeinträchtigt wird (Mitchell und Dean, 1995), hat der Verlust dieser Untereinheit in *U. maydis* einen konstitutiv filamentösen Phänotyp zur Folge (Dürrenberger *et al.*, 1998).

In *Neurospora crassa* wurden mittlerweile zahlreiche Komponenten des cAMP-abhängigen Signalwegs identifiziert, die sowohl Morphogenese und Paarung als auch die Hitzeschockantwort steuern (Lengeler *et al.*, 2000)

Eine der am besten untersuchten Spezies im Hinblick auf die Proteinkinase A stellt *S. cerevisiae* dar. Hier konnten nicht nur viele der an der cAMP-abhängigen Signaltransduktion beteiligten Proteine charakterisiert werden, sondern auch zahlreiche regulatorische Prozesse beschrieben werden, die durch die Proteinkinase A vermittelt werden. In Hefe wird der PKA-Weg durch das Nährstoffangebot reguliert. Das Vorhandensein von vergärbaren Zuckern oder der Mangel an Stickstoffquellen erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dies geschieht über Rezeptoren, wie dem Glukosesensor Gpr1p oder der Ammoniumpermease Mep2p (Lorenz *et al.*, 2000; Lorenz und Heitman, 1998), die über GTP-bindende Proteine wie Gpa2p und Ras2p (Lorenz und Heitman, 1997; Gimeno *et al.*, 1992) die Adenylylzyklase stimulieren. Die erhöhte cAMP-Konzentration wiederum bewirkt eine Aktivierung der katalytischen

Untereinheiten der PKA. In *S. cerevisiae* kodieren drei Gene für die Isoformen der katalytischen PKA-Untereinheit, *TPK1-3*. Es konnte gezeigt werden, daß Tpk2p als positiver Regulator der Pseudohyphenbildung agiert, während Tpk1p und Tpk3p diese hemmen; wahrscheinlich über einen Rückkopplungsmechanismus, der auf den cAMP-Spiegel wirkt (Robertson und Fink, 1998; Pan und Heitman, 1999). Dennoch sind die drei Isoformen bezüglich ihrer Funktion in gewissem Maße redundant, denn die Expression eines der drei *TPK*-Gene ist ausreichend, um die Lebensfähigkeit eines *tpk*-Mehrfachdeletionsstammes zu erhalten; im Gegensatz dazu ist die Disruption aller drei *TPK*-Gene letal (Toda *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998).

Während Stickstoffmangel als Induktor für die PKA-vermittelte Pseudohyphenbildung fungiert, hat u.a. das Vorhandensein von vergärbaren Zuckern eine negative Auswirkung auf die Streßantwort. Die hohe PKA-Aktivität hemmt in diesem Falle die Expression von Genen, die für die Bewältigung eines Hitzeschocks, von hochosmotischen Bedingungen oder anderem Streß benötigt werden (Smith *et al.*, 1998; Norbeck und Blomberg, 2000).

Obwohl in *C. albicans* nicht allein Nährstoffmangelbedingungen, sondern vielmehr positive Induktoren die Hyphenbildung auslösen, ist auch hier die Proteinkinase A an der Regulation des filamentösen Wachstums beteiligt. Die Bildung von Keimschläuchen korreliert mit dem cAMP-Spiegel in der Zelle (Sabie und Gadd, 1992); darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die extrazelluläre Gabe von cAMP das filamentöse Wachstum stimuliert (Niimi *et al.*, 1980). Weiterhin führt die Anwendung spezifischer PKA-Inhibitoren zu einer Hemmung der GlcNAc-induzierten Hyphenbildung (Castilla *et al.*, 1998). Schließlich ist der Befund, daß Ras1p aus *C. albicans* für die Differenzierung von Hyphen in serumhaltigem Medium benötigt wird (Feng *et al.*, 1999), ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des PKA-Signalwegs für die Morphogenese.

4.1.1 Tpk1p und Tpk2p sind die einzigen Tpk-Isoformen in *C. albicans*

Nachdem mit Tpk2p bereits eine katalytische Untereinheit der Proteinkinase A aus *C. albicans* charakterisiert und ihre Bedeutung die die Hyphenbildung herausgestellt werden konnte (Sonneborn, 1999), ermöglichte die Sequenzierung des *C. albicans*-Genoms die Identifizierung eines zu *TPK2* homologen Gens, *TPK1*, das für eine weitere Isoform einer katalytischen PKA-Untereinheit kodiert. Der durchgeführte Vergleich der abgeleiteten Tpk1-Proteinsequenz mit den Sequenzen anderer Tpk-Proteine aus *C. albicans* und *S. cerevisiae* zeigt für den C-terminalen Bereich die allen Tpk-Isoformen eigene, konservierte Region. Die Homologie in diesem Abschnitt von etwa 300 AS Länge beträgt zwischen den Tpk-Proteinen der beiden Spezies über 75% Identität. Mit 85% für ScTpk1 und ScTpk3p sowie 88% für CaTpk2p und ScTpk2p finden sich bei diesen Paaren gar noch höhere Übereinstimmungen. Faßt man diese Sequenzvergleiche in einem phylogenetischen Stammbaum zusammen, so ergeben sich interessante verwandschaftliche Beziehungen (Abb. 4.1). Wie aufgrund der berechneten Identitäten erwartet, befinden sich sowohl CaTpk2p und ScTpk2p wie auch ScTpk1p und ScTpk3p in engem, verwandschaftlichem Verhältnis. Für die Beziehung von CaTpk2p und ScTpk2p spricht zudem neben der hohen Homologie auf Proteinebene das Auftreten von glutaminreichen Regionen am N-Terminus, die für diese beiden Tpk-Isoformen charakteristisch sind.

Bemerkenswert ist jedoch vor allem, daß das neu identifizierte CaTpk1p einerseits und ScTpk1p und ScTpk3p andererseits auf demselben Ast des Stammbaums zu finden sind, wobei sich die Trennung in die zwei *S. cerevisiae*-Isoformen evolutionär später vollzogen hat. Dies spricht dafür, daß aus einem Vorläufer in *S. cerevisiae* (vermutlich durch Genduplikation) zu einem späteren Zeitpunkt zwei Gene entstanden sind, die nun mit *TPK1* und *TPK3*

bezeichnet werden. Als weiteres Indiz für diese Hypothese kann die Tatsache dienen, daß ScTpk1p und ScTpk3p ähnliche Funktionen in der Regulation der Pseudohyphenbildung von *S. cerevisiae* (gegensätzlich zur ScTpk2p-Funktion) innehaben.

Als wichtige Konsequenz aus dieser Genduplikation für die Beurteilung der Verhältnisse in *C. albicans* folgt weiterhin die Annahme, daß mit *CaTPK1* und *CaTPK2* nur zwei Gene in dieser Spezies existieren dürften, die für katalytische Untereinheiten der PKA kodieren. Dafür spricht nicht nur die in Abb. 4.1 dargestellte Beziehung der Tpk-Isoformen, sondern auch das Fehlen von weiteren homologen Sequenzen im *C. albicans*-Genom.

Es gibt gute Gründe, nur den C-terminalen Bereich der Proteinsequenzen zu berücksichtigen. Bei sehr geringen Homologien ist das Ergebnis eines Clustalx-Vergleichs, wie er für die vorliegenden Berechnungen verwendet wurde, als unzuverlässig einzuschätzen, da das Programm zufällige Übereinstimmungen als Identitäten überbewertet. Aus diesem Grund ergibt die Berechnung auf Basis der kompletten Proteinsequenz keine Verbesserung der Homologievergleiche, sondern stellt im Gegenteil einen Unsicherheitsfaktor dar.

Neben den mithilfe von Computeranalysen gewonnenen Daten gibt es aber auch andere Anhaltspunkte, daß mit CaTpk1p und CaTpk2p die Familie der katalytischen PKA-Untereinheiten in *C. albicans* komplett ist. So zeigt die Northern-Blot-Analyse der *CaTPK1* und *CaTPK2*-Transkripte keinen Hinweis auf eine weitere *TPK*-Isoform (3.1.3). Da als *CaTPK2*-Sonde ein Fragment aus dem divergenten 5'-Bereich des *CaTPK2*-

Gens ist dies in diesem Fall zwar auch keineswegs zu erwarten; die Wahl der *CaTPK1*-Sonde, die große Bereiche des konservierten 3'-Bereichs einschließt, ließe eine Detektion einer anderen *TPK*-Isoform hingegen zu. Zwar wurde auch mit dieser Sonde in keinem Fall das *TPK2*-Transkript detektiert, doch wäre zu vermuten, daß eine potentielle dritte *TPK*-Gen aus *C. albicans* analog zu den Verhältnissen in *S. cerevisiae* eine höhere Homologie zu *CaTPK1* aufwiese, was eine Detektion mit der *TPK1*-Sonde wahrscheinlicher machen würde.

Schließlich gibt auch die Durchführung der Disruption beider Allele von *CaTPK1* in einem *tpk2/tpk2*-Stamm Grund zur Annahme, daß nur zwei *TPK*-Isoformen in *C. albicans* existieren. Während die Disruption beider Kopien von *CaTPK1* in einem Wildtypstamm problemlos möglich ist (M. Gerads, pers. Mitteilung), konnte vor einem *tpk2/tpk2*-Hintergrund lediglich ein Allel von *CaTPK1* disruptiert werden. Erst die Verwendung eines Konstruktes, mit dem das verbleibende *CaTPK1*-Allel unter der Kontrolle des induzierbaren *PCK1*-Promotors exprimiert werden kann, führte zu einem *C. albicans*-Stamm, mit einer annähernd vollständig reprimierbaren Tpk-Aktivität. Im Northern-Blot ist für diesen Stamm unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingungen nur ein äußerst schwaches *TPK1*-Transkript detektierbar (B. Tebarth, pers. Mitteilung). Weiterhin verursacht die Repression des *PCK1*-Promotors auf glukosehaltigem Medium einen schweren Wachstumsdefekt in diesem Stamm, während eine moderate *PCK1p*-Expression normales Wachstum erlaubt (3.1.5). Diese Daten decken sich mit den Befunden in *S. cerevisiae*, nach denen ein Stamm, in dem alle drei *TPK*-Gene deletiert sind, nicht lebensfähig ist. Erstaunlicherweise führt die vollständige Induktion des *PCK1*-Promotors wiederum zu einem verminderten Wachstum. Da auch bei episomaler Überexpres-

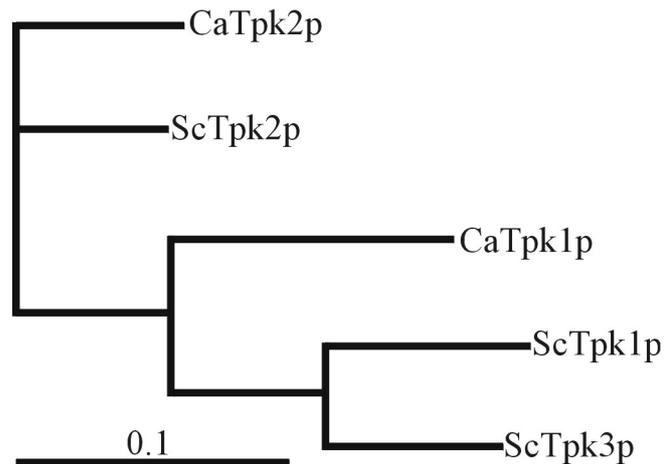


Abb. 3.1: Phylogenetischer Stammbaum der Tpk-Isoformen aus *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Die Skala unten links gibt die verwandtschaftliche Nähe der Proteine an, dabei steht die Balkenlänge für 0,1 Austausch pro Aminosäure.

sion von *CaTPK1* oder *CaTPK2* leichte Einschränkungen im Wachstum festgestellt werden konnten (vgl. 3.1.2), muß man davon ausgehen, daß die Überexpression von *CaTPK*-Genen ähnlich wie in *S. cerevisiae* toxisch ist (Nehlin und Ronne, 1990).

Insgesamt läßt sich anhand der gewonnenen Daten mit großer Sicherheit die Existenz eines weiteren *TPK*-Gens in *C. albicans* ausschließen. Da bei anderen Pilzspezies die Charakterisierung der katalytischen PKA-Untereinheiten noch weitgehend lückenhaft ist, bleibt abzuwarten, ob eine generelle Aussage über die Zahl an Isoformen pro Art möglich ist.

4.1.2 Tpk1p ist ein Regulator der Hyphenbildung

Für Tpk2p aus *C. albicans* wurde – in Analogie zur Funktion von ScTpk2p – bereits eine Rolle bei der Hyphenbildung nachgewiesen (Sonneborn, 1999). Allerdings sind *tpk2*-Deletionsstämme unter vielen Bedingungen noch zu filamentösem Wachstum befähigt. Am ausgeprägtesten zeigt sich der *tpk2*-assoziierte Hyphendefekt bei 30°C auf festem Spidermedium. Die Deletion von *TPK1* hat im Gegensatz dazu einen ausgeprägten Effekt auf die Hyphenbildung auf den gängigen festen Induktionsmedien. So führt bereits die Deletion eines *TPK1*-Allels auf festen Medien mit Serum oder GlcNAc als Induktor zu einer starken Verringerung des hyphalen Wachstums und auf festem Spidermedium zu einem vollkommen afilamentösen Phänotyp bei 37°C (3.1.4).

Vergleicht man den Hyphendefekt von verschiedenen *tpk*-Deletionsstämmen, so fällt auf, daß eine konditionale *tpk1/tpk2*-Doppelmutante, bei der das letzte *TPK1*-Allel unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors exprimiert wird, unter allen getesteten Bedingungen völlig afilamentös ist. Besonders bemerkenswert ist jedoch, daß der Defekt der Hyphenbildung in den einzelnen *tpk*-Deletionsstämmen nicht nur in bezug auf den verwendeten Induktor variiert, sondern auch davon abhängt, ob die Induktion auf festem oder in flüssigem Medium durchgeführt wurde.

	WT	<i>tpk1</i>	<i>tpk2</i>	<i>tpk1/tpk2</i>
Serum fest	+++	+	++	-
Serum flüssig	+++	+++	-	-
Spider fest	+++	-	+++	-
Spider flüssig	+++	++	+	-

Tab. 4.1: Hyphendefekt von *tpk*-Deletionsstämmen

Dargestellt ist die Hyphenbildung von Stämmen in denen beide Kopien von *tpk1* oder *tpk2* deletiert wurden, sowie einer konditionalen Doppeldisruptante, bei der die letzte Kopie von *TPK1* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors steht (*tpk1/tpk2*) im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei 37°C.

Wie Tabelle 4.1 zeigt, weisen *tpk1*-Deletionsstämme eine stark bis vollkommen unterdrückte Hyphenbildung auf festen Medien auf, während die Hypheninduktion in flüssigen Medien wenig bis gar nicht beeinträchtigt ist. Bemerkenswerterweise kehrt sich dieser Effekt bei *tpk2*-Deletionsstämmen nahezu um. In Ergänzung zu bisherigen Beobachtungen führt die Disruption von *TPK2* in flüssigem Medium mit Serum als Induktor zu einem vollständig afilamentösen Wachstum. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die beiden Tpk-Isoformen in *C. albicans* zwar beide in die Regulation der Morphogenese involviert sind, aber dennoch eine Spezifität im Hinblick auf die hypheninduzierenden Bedingungen besteht.

Für *S. cerevisiae* konnte ScTpk2p als diejenige Tpk-Isoform identifiziert werden, die hauptsächlich für die Kontrolle der Pseudohyphenbildung verantwortlich ist. Ein wichtiger Unterschied zur Morphogenese in *C. albicans* besteht darin, daß nicht allein Nährstoffmangel als Induktor für die Hyphenbildung fungiert, sondern zahlreiche Signale die Filamentbildung steuern. Dazu gehören neben chemischen Effektoren wie Serum oder GlcNAc auch die Tem-

peratur oder der pH-Wert. Diese Vielzahl von morphogenetischen Signalen hängt mit Sicherheit damit zusammen, daß *C. albicans* in seinem natürlichen Habitat (dem menschlichen Körper) auf unterschiedliche Bedingungen mit diversen zellulären Antworten reagiert. Vor diesem Hintergrund erscheint es nur logisch, daß die Morphogenese in *C. albicans* differenzierter reguliert ist als in *S. cerevisiae*.

Eine möglicher Grund für das abweichende Verhalten von *tpk*-Deletionsstämmen in flüssigen und auf festen Medien ist ein differentielles Funktionsprofil der beiden Tpk-Isoformen in *C. albicans*. Der Phänotyp der *tpk*-Deletionen ist erklärbar, wenn man annimmt, daß Tpk2p für die Initialisierung und Tpk1p für die Aufrechterhaltung hyphalen Wachstums verantwortlich ist. In flüssigen Medien beobachtet man nur die Anfangsstadien der Hyphenmorphogenese, während die Ausbildung von Filamenten auf festen Medien einen Zeitraum von mehreren Tagen umfaßt. *tpk2*-Deletionsstämmen zeigen daher einen starken Hyphendefekt in flüssigen Induktionsmedien, da die Keimschlauchbildung *per se* gehemmt ist. Hingegen wirkt sich eine *tpk1*-Deletion unter diesen Bedingungen nicht auf die Filamentbildung aus, da die für die Erhaltung des Hyphenwachstums nötigen Prozesse noch nicht ablaufen. Auf festen Medien sind diese Mechanismen jedoch essentiell für die Ausprägung des Hyphensaumes, der bei *tpk1*-Deletionsstämmen nicht gebildet wird. Gleichwohl findet man auf festen Induktionsmedien nach kurzer Inkubationszeit Zellen, die Keimschläuche aufweisen, später aber von Hefezellen überwachsen werden. Dabei sind die regulatorischen Faktoren zur Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums vermutlich nicht auf die primären Induktoren (wie Serum oder GlcNAc) beschränkt, sondern dürften vor allem die allgemeinen Umweltbedingungen, etwa die Temperatur, betreffen. Somit ist auch der stärkere Hyphendefekt eines *tpk2*-Deletionsstammes bei 30° C zu erklären, da hier ein zusätzliches Signal (37°C) fehlt, das hauptsächlich die Regulation durch Tpk1p beeinflusst. Natürlich muß angenommen werden, daß auch in *C. albicans* die Funktion der Tpk-Isoformen in gewissem Maße redundant ist. Anderenfalls würde die fehlende Initialisierung des hyphalen Wachstums in *tpk2*-Deletionsstämmen auf festem Medium zu einem schwereren Hyphendefekt führen.

Ein weiterer Tpk2p-assoziiertes Phänotyp ist in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung. Wie in Abschnitt 3.1.8 gezeigt, hat die Deletion beider *TPK2*-Allele den Verlust des invasiven Wachstums zur Folge. Diese Fähigkeit von Zellen, in den Agar hineinzuwachsen, wurde bei haploiden *S. cerevisiae*-Stämmen als ein weiteres Beispiel für die Regulation der Morphogenese durch die Proteinkinase A ausführlich untersucht. Dabei spielt das *FLO11*-Gen eine Rolle, das für ein Zelloberflächenprotein kodiert, welches sowohl für die Bildung von pseudohyphalen Zellketten als auch für die Adhäsion an Oberflächen benötigt wird. Die Expression von *FLO11* wird wahrscheinlich sowohl über den MAPK-Weg als auch über ScTpk2p kontrolliert (Rupp *et al.*, 1999; Reynolds und Fink, 2001). In *C. albicans* wird das invasive Wachstum ebenfalls spezifisch über Tpk2p reguliert, da eine Deletion beider *TPK1*-Allele keine Auswirkung auf die Invasivität zeigt.

In bezug auf die allgemeine Kontrolle der Morphogenese durch Tpk1p und Tpk2p weist dieser Phänotyp wiederum auf eine Mitwirkung von Tpk2p bei der Initialisierung des filamentösen Wachstums hin, denn die Adhäsion an Oberflächen, die der erste Schritt von invasivem Wachstum ist, stellt im menschlichen Wirt vermutlich auch den Beginn der Hyphenbildung dar. Letztere dient bei einer beginnenden *C. albicans*-Infektion der Penetration von Zellschichten und ermöglicht es dem Pilz, in tiefere Gewebeschichten und in den Blutstrom zu gelangen. Vor dem Durchwachsen muß *C. albicans* aber erst an die Oberfläche der Wirtszelle adhären, wozu eine Tpk2p-Aktivität nötig wäre. Da auch in *Candida*-Spezies ein Flo11p-Homolog vorhanden ist, das bei Expression in *S. cerevisiae*-Zellen diese zur Adhäsion an Säugerzellen befähigt (Sundstrom, 1999; Cormack *et al.*, 1999), ist eine ähnliche Regulation denkbar. Der leichtere Hyphendefekt einer *tpk2*-Deletion ließe sich somit auch durch die noch

bestehende Aktivität des MAPK-Weges erklären, der wie in *S. cerevisiae* an der Flo11p-Regulation beteiligt sein könnte.

Die gewonnenen Erkenntnisse sprechen für ein Modell, in dem Tpk1p und Tpk2p gemeinsam das hyphale Wachstum steuern. Die zentrale Rolle, die dem cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg dabei zukommt, wird in diesem Zusammenhang durch die vollkommen a filamentöse Morphologie von konditionalen *tpk1/tpk2*-Doppeldisruptanten auf allen getesteten Induktionsmedien verdeutlicht. Der unterschiedliche Einfluß der Tpk-Isoformen auf die Hyphenbildung in flüssigen oder auf festen Medien stützt darüberhinaus eine Hypothese, nach der Tpk2p für die Initialisierung der Hyphenbildung und die Adhäsion an Oberflächen verantwortlich ist, während die Tpk1p-Aktivität für die weitere Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums benötigt wird. Dabei scheinen die Funktionen der beiden Tpk-Isoformen teilweise redundant zu sein.

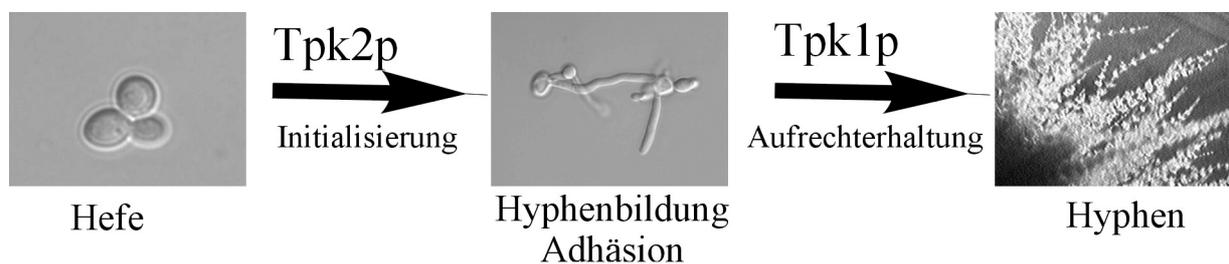


Abb. 4.3: Modell der Regulation hyphalen Wachstums durch Tpk1p und Tpk2p

4.1.3 Die zelluläre Streßantwort von *C. albicans* wird durch die Tpk-Isoformen negativ reguliert

Die Proteinkinase A hat in *S. cerevisiae* vor allem die Aufgabe, der Zelle die Verfügbarkeit einer Kohlenstoffquelle zu übermitteln. Sie übt dabei neben einer positiven Wirkung auf Wachstum und Glykolyse auch eine negativ regulatorische Rolle auf die Glukoneogenese, die Synthese der Speicherstoffe Trehalose und Glykogen sowie auf die Streßresistenz aus (Thevelein und de Winde, 1999). All diese Mechanismen passen in ein Konzept, nach dem eine hohe PKA-Aktivität der Zelle optimale Wachstumsbedingungen signalisiert. Der Einfluß der PKA auf die Streßresistenz läßt sich durch mehrere Faktoren erklären. Erstens hat die durch die PKA reprimierte Trehaloseakkumulation nicht nur den Sinn, Speicherstoffe zu bilden, sondern dient auch der Erhöhung der Osmotoleranz. Der zweite Mechanismus, über den die Proteinkinase A die Streßresistenz reguliert, läuft über die Inhibierung der Transkriptionsfaktoren Msn2p und Msn4p. Diese binden auf Streßsignale hin an „stress responsive elements“ (STRE) und aktivieren dadurch Gene, die in die zelluläre Streßantwort involviert sind (Marchler *et al.*, 1993; Martinez-Pastor *et al.*, 1996).

Die Deletion von Genen, die für Komponenten des PKA-Signalweges kodieren, hat dementsprechend meist eine Erhöhung der Streßtoleranz derartiger Stämme zur Folge. Beispielsweise hat ein Stamm, in dem *ScTPK2* und *ScTPK3* disruptiert wurden und das *ScTPK1*-Gen gegen eine konstitutiv schwach exprimierte Form ausgetauscht wurde, eine höhere Überlebensrate auf hochosmolarem Medium, während die Deletion des Gens für die regulatorische Untereinheit *BCY1* den gegenteiligen Effekt hat (Norbeck und Blomberg, 2000). Für die Hitzeschockantwort konnte ebenfalls eine Beteiligung der Proteinkinase A über die Regulation von Msn2p und Msn4p nachgewiesen werden. Hierbei spielt unter anderem die durch Hitzeschock induzierte Phosphorylierung von Msn2/4p eine Rolle, die durch Zugabe von cAMP unterdrückt werden kann (Garreau *et al.*, 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, daß auch in *C. albicans* die Proteinkinase A in die Regulation der Streßantwort involviert ist (Abb. 3.10). *C. albicans*-Zellen eines Wildtypstammes, die auf Medium mit 1,4 M NaCl ausplattiert werden, zeigen eine um 75% erniedrigte Überlebensrate im Vergleich zu Zellen, die auf Medium ohne NaCl wachsen. Dieser Effekt wird durch die Disruption von *TPK1* bzw. *TPK2* nicht aufgehoben, sondern eher noch verstärkt. Die etwas geringere Überlebensrate von *tpk1*- und *tpk2*-Disruptionsstämmen korreliert allerdings mit der verminderten Wachstumsrate auf glukosehaltigem Medium (vgl. 3.1.5), so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Disruption einer *TPK*-Isoform *per se* keinen Einfluß auf die Osmotoleranz hat. Erst die sehr niedrige *TPK*-Expression einer konditionalen *tpk1/tpk2*-Doppeldisruptante hatte Auswirkungen auf die Osmotoleranz. Wurde das induzierbare *TPK1*-Allel unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors durch Anzucht der Vorkultur auf glukosehaltigem Medium reprimiert, so zeigten diese Zellen keinen Unterschied in der Zahl der koloniebildenden Einheiten auf niedrig- und hochosmolarem Medium. Der Koloniedurchmesser war jedoch aufgrund des allgemeinen Wachstumsdefektes eines solchen Stammes kleiner als der der anderen getesteten Stämme. Diese Tatsache hat aber keinen Einfluß auf die Aussage des Experimentes, da nicht die Zellzahl als Maßstab für die Überlebensfähigkeit unter extremen osmotischen Bedingungen genommen wurde, sondern die koloniebildenden Einheiten, daß heißt der Anteil an ausplattierten Zellen, die teilungsfähig sind.

Daß der beobachtete Effekt der Repression des *PCK1*-Promotors zuzuschreiben ist, konnte durch Anzucht der Vorkultur in Medium mit 2% Casaminsäuren gezeigt werden. Derartig vorbehandelte Zellen zeigen aufgrund der höheren *TPK1*-Expression auf hochosmolarem Medium wieder eine deutlich verringerte Überlebensrate. Die Verwendung von glukosehaltigem Medium als hyperosmotisches Umfeld und die dadurch bewirkte *PCK1p*-Repression hat dabei zwar eine Überlebensrate zur Folge, die höher ist als in den Kontrollstämmen, erlaubt aber dennoch die Einschätzung des *PCK1p*-Einflusses, denn bei der Zählung der koloniebildenden Einheiten entscheidet lediglich der Status der ersten Zelle über die Bildung einer Kolonie, und dieser wird primär durch das Medium der Vorkultur determiniert.

Bei der Bestimmung der Thermotoleranz von *tpk*-Deletionsstämmen ergab sich erwartungsgemäß ein ähnlicher Effekt wie bei der Osmotoleranz. Hier wurden die koloniebildenden Einheiten von verschiedenen Verdünnungen einer Kultur ermittelt, bevor und nachdem die Zellen einem zwanzigminütigen Hitzeschock von 55° C ausgesetzt waren.

Die *tpk1*- und *tpk2*-Deletionsstämmen erwiesen sich dabei als ebenso hitzeempfindlich wie der Wildtypstamm, wobei die etwas geringere Koloniezahl wiederum auf ein allgemeines Wachstumsdefizit zurückzuführen sein dürfte. Obwohl auch der konditionale Doppeldisruptionsstamm unter den gegebenen (*PCK1p*-reprimierenden) Bedingungen ein schlechtes Wachstum zeigt, was an der geringen Koloniegröße abzulesen ist, haben deutlich mehr Zellen den Hitzeschock überlebt als in den Kontrollstämmen. Selbst bei einer Verdünnung, die keine Koloniebildung des Wildtypstammes oder der *tpk1*- und *tpk2*-Deletionsstämmen mehr ermöglicht, können bei der konditionalen Doppeldisruptante noch koloniebildende Einheiten nachgewiesen werden (Abb. 3.11).

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse einen eindeutigen Einfluß der Proteinkinase A bei der Regulation der zellulären Streßantwort in *C. albicans*. Dabei kann diese Rolle nicht einer der beiden *Tpk*-Isoformen zugesprochen werden. Vielmehr scheint die Gesamtaktivität der PKA für die Beurteilung der Streßbedingungen herangezogen zu werden. Dies macht durchaus Sinn, denn die Komplexität der Streßantwort spricht für eine Integration von mehreren regulatorischen Signalen, ehe die Zelle Mechanismen in Gang setzt, die derart extrem in den zellulären Haushalt eingreifen, wie die zelluläre Bewältigung von Umweltstreß es erfordert.

4.2 Regulation des Transkriptionsfaktors Efg1p

Filamentöses Wachstum in *C. albicans* wird –anders als in *S. cerevisiae*– nicht primär durch Stickstoffmangel ausgelöst, sondern ist als Teil der infektiösen Mechanismen über diverse extrazelluläre Induktoren reguliert. Bislang ist über die genaue Natur dieser morphogenetischen Signale wenig bekannt, und nur einige sind als spezifische Faktoren definiert. Zu diesen Effektoren gehören u.a. ein neutraler pH-Wert (Buffo *et al.*, 1994), eine Erhöhung der Temperatur und einige chemische Substanzen wie GlcNAc (Cassone *et al.*, 1985) oder Prolin (Land *et al.*, 1975). Die beiden letztgenannten Substanzen könnten dabei als Bestandteil von Serum in Zusammenhang mit dem effektivsten bislang bekannten Induktor stehen. Alle erwähnten Induktionsbedingungen spiegeln wohl in gewisser Weise physiologische Signale wider, die *C. albicans* zur Hyphenbildung veranlassen. Bei einem weiteren potenten Induktor hyphalen Wachstums, dem sogenannten „Spider“-Medium bestehen derart offensichtliche Zusammenhänge mit Signalen, die *C. albicans* im menschlichen Wirt vorfindet, nicht. Zwar ist Spidermedium als Nährstoffmangelmedium diskutiert worden, doch sprechen einige Befunde gegen diese Hypothese. Sowohl die Zugabe von Glukose als auch eine zusätzliche Stickstoffgabe haben keinen Einfluß auf die Hyphenbildung auf Spidermedium (Ernst, 2000). Außerdem deuten nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente auf eine Beteiligung der Salzkonzentration bei der spidervermittelten Hypheninduktion hin, da einerseits Spidermedium mit niedriger Salzkonzentration die Hyphenbildung nicht mehr induziert, und andererseits auch andere Medien mit hoher Salzkonzentration die Bildung von Hyphen fördern (unveröffentlichte Daten). Eine weitere Umweltbedingung, die filamentöses Wachstum bei *C. albicans* bewirkt, ist Sauerstoffmangel. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß der Transkriptionsfaktor Efg1p, der bei allen vorher genannten Induktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation filamentösen Wachstums spielt, in anaerobem Milieu für die Hyphenbildung entscheidend ist (Sonneborn, 1999; Riggle *et al.*, 1999).

Dennoch bleibt Efg1p einer der zentralen Regulatoren der Morphogenese in *C. albicans*. Wie bereits erwähnt, deuten viele Anhaltspunkte darauf hin, daß Efg1p im PKA-Signalweg die Differenzierung von Hyphen steuert. Daneben gibt es Hinweise auf die Existenz von mindestens zwei parallelen Wegen; einer MAPK-Kaskade, die Homologien zu der Signalkaskade aufweist, die in *S. cerevisiae* die Pseudohyphenbildung und die Paarung steuert, sowie einen dritten Weg, der die anaerobe Hyphenbildung kontrolliert.

4.2.1 Efg1p ist ein Phosphoprotein

Bei der essentiellen Funktion, die Efg1p auf vielen Induktionsmedien für die Morphogenese hat, stellt sich natürlich die Frage nach der genauen Regulation dieses Transkriptionsfaktors. Aufgrund seines Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel lassen sich drei Efg1p-Modifikationen unterschiedlicher Größe postulieren (Sonneborn, 1999). Durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase ist im Rahmen dieser Arbeit erstmals der Nachweis gelungen, daß es sich bei diesen Modifikationen um Phosphorylierungen handelt. Dabei können die beiden größeren Formen von 92 und 90 kDa vollständig in die 88 kDa-Form überführt werden (3.2.1.2). Da ein Unterschied von 2 kDa eigentlich nicht aufgrund einer einzelnen Phosphatgruppe auftreten kann, spricht dieses Laufverhalten für zwei Mehrfachphosphorylierungen, wobei die genaue Position dieser Phosphorylierungen nicht bestimmbar ist.

Für die 92 kDa-Modifikation konnte durch die Verwendung von entsprechenden Antikörpern gezeigt werden, daß sich bei dieser Modifikation eine oder mehrere Phosphatgruppen an einem Threonin befinden. Das Signal, das mit polyklonalen Antikörpern gegen Phospho-Threonin erhalten wurde, korreliert eindeutig mit der 92 kDa-Bande, während für die 90 kDa-Form keine Phosphorylierung mit diesen Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Daß es

sich bei dem erhaltenen Signal tatsächlich um die größte der drei Modifikationen handelt, kann auch aus anderen Umständen belegt werden. Offenbar ist diese Modifikation sehr instabil, so daß sie bei einer Aufreinigung mittels Immunopräzipitation nicht mehr auftritt. Bei so aufgereinigten Rohextrakten konnte mit den Anti-Phospho-Threonin Antikörpern keine Phosphorylierung gezeigt werden. Dies gilt ebenso für Varianten von Efg1p, die nur noch die 88 kDa-Modifikation im Western-Blot zeigen. Die letztgenannten Hinweise sprechen indes nicht gegen eine Beteiligung von Threonin-Resten bei der Phosphorylierung der 90 kDa-Form von Efg1p, da die verwendeten Antikörper nicht zwangsläufig alle phosphorylierten Threonin-Reste erkennen.

Diese experimentellen Befunde sprechen eindeutig dafür, daß es sich bei Efg1p um ein Phosphoprotein handelt, bei dem neben einer unphosphorylierten Modifikation von 88 kDa zwei distinkte, phosphorylierte Formen von 90 und 92 kDa existieren. Dabei ist an der 92 kDa-Modifikation mindestens eine Threonin-Phosphorylierung beteiligt.

4.2.2 Verschiedene Phosphorylierungen determinieren die Efg1p-Funktion

Durch den Austausch verschiedener Aminosäurereste in Efg1p konnte der Einfluß mehrerer potentieller Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden, wobei angenommen werden kann, daß mehrere Kinasen an der Regulation von Efg1p beteiligt sind. Diese Hypothese läßt sich anhand der Phänotypen belegen, die ein Austausch einzelner Aminosäurereste nach sich zieht. Der bemerkenswerteste Effekt ist dabei durch den Austausch einer potentiellen PKA-Phosphorylierungssequenz an Position T206 zu beobachten. Dieses Threonin stellt innerhalb der APSES-Domäne die einzige mögliche Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A in Form der Sequenz Arginin-Valin-Threonin (RVT) dar, die der Konsensussequenz für eine PKA-Phosphorylierung entspricht (Kennelly und Krebs, 1991). Der Austausch des T206 zu Alanin hat einen drastischen Effekt auf die Fähigkeit von Efg1p, die Hyphenbildung zu stimulieren. Zwar können Zellen, die ausschließlich die Efg1-T206A-Variante exprimieren weiterhin Pseudohyphen ausbilden, doch sind sie sowohl auf festem wie in flüssigem Spidermedium afilamentös. Im Gegensatz dazu führt der Austausch des T206 zu Glutamat nicht nur zur Erhaltung des filamentösen Phänotyps, sondern vielmehr zu einer stärkeren Hyphenbildung in Spidermedium im Vergleich zu Zellen, die das Wildtyp-Efg1p exprimieren. Wie läßt sich ein derartiger Effekt erklären?

Der Austausch einer als Phosphatakzeptor fungierenden Aminosäure (wie Threonin) gegen eine aliphatische Aminosäure hat zur Folge, daß diese Stelle nicht mehr der Regulation der phosphorylierenden Kinase unterliegt. Wird hingegen die zu phosphorylierende Aminosäure gegen Glutamat oder Aspartat ausgetauscht, so kann deren Carboxylgruppe unter bestimmten Umständen die negativ geladene Phosphatgruppe imitieren. Bezogen auf T206 von Efg1p heißt das: Die Hypothese der PKA-Phosphorylierung wird dadurch bestätigt, daß die nicht phosphorylierbare Variante Efg1-T206A einen Hyphendefekt zeigt, während das T206E-Derivat von Efg1p eine permanent phosphorylierte Form vortäuscht und somit hyperaktiv ist. Mit diesem „Werkzeug“ läßt sich unter anderem der Einfluß einer PKA-Phosphorylierung auf die Efg1-vermittelte Hyphenbildung bei verschiedenen Induktoren beobachten. Während der Austausch von T206 zu Glutamat bzw. Alanin bei Spidermedium als Induktor gewissermaßen ein „alles oder nichts“-Effekt ist, zeigen Zellen, die die T206A-Variante exprimieren, in flüssigem Spidermedium nur einen leichten Hyphendefekt. Hier bleibt die Geschwindigkeit der Hyphenbildung bei Expression der T206E-Variante leicht hinter den Wildtyp-Werten zurück, während Kontrollzellen ohne Efg1p-Expression auch bei Induktion durch Serum afilamentös sind. Bei GlcNAc als Induktor ergibt sich ein ähnliches Bild wie für Serum, allerdings auf einem niedrigeren Niveau.

Diese Ergebnisse sprechen für unterschiedliche morphogenetische Signale, welche durch Spidermedium einerseits und Serum bzw. GlcNAc andererseits repräsentiert werden. Bei Spidermedium als Induktor scheint dieses Signal hauptsächlich über eine PKA-Phosphorylierung an Efg1p weitergegeben werden. Daher hat eine Veränderung der PKA-Phosphorylierungsstelle einen drastischen Effekt auf die Morphogenese. Bei Induktion durch Serum dürften hingegen viele Komponenten die Efg1p-Aktivität bestimmen, so daß die Veränderung der PKA-Regulation keinen großen Einfluß auf die Hyphenbildung hat. Hier wie bei GlcNAc als Induktor zeigt sich auch, daß die „Nachahmung“ einer Phosphatgruppe durch Glutamat ihre Grenzen hat. Anders als bei Spidermedium scheint hier der Glutamataustausch nicht in der Lage zu sein, die Aktivität des Wildtypproteins zu vermitteln. Dennoch deutet die Tatsache, daß die T206E-Variante stets aktiver ist als das T206A-Derivat von Efg1p, auf eine Phosphorylierung von Efg1p durch die Proteinkinase A.

Daß der beobachtete Effekt für diese Position spezifisch ist, zeigt sich aus den Experimenten mit Austauschen von T207 und T208. In beiden Fällen bewirkt ein Austausch dieser Aminosäuren keine Veränderung der Hypheninduktion auf allen getesteten Medien. Außerdem konnte mit dem Austausch des T208 eine Phosphorylierung von Efg1p durch die Caseinkinase II ausgeschlossen werden, deren potentielle Zielsequenz an dieser Stelle zu finden ist.

Wenn die Proteinkinase A Efg1p an Position T206 phosphoryliert, wäre nach den in 4.2.1 getroffenen Aussagen zu erwarten, daß sich das Laufverhalten eines nicht-phosphorylierbaren T206A-Derivats von dem des Wildtyp-Proteins im SDS-Gel unterscheidet. Eine derartige Veränderung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch der Nachweis über Antikörper gegen Phospho-Threonin war für das T206A-Derivat möglich (Abb. 3.15). Ebenso zeigten Efg1-Proteine, die in *tpk1*- oder *tpk2*-Deletionsstämmen exprimiert wurden, mit dem Auftreten der drei 88, 90 und 92 kDa-Modifikationen das gleiche Laufverhalten wie Efg1p im Wildtyp. Während letzteres Phänomen noch dadurch zu erklären ist, daß die Funktionen der beiden Tpk-Isoformen redundant sind und folglich in jedem Fall eine Tpk-Isoform als Efg1p-Kinase verfügbar blieb, spricht das Laufverhalten der T206A-Variante von Efg1p eigentlich gegen die vorher aufgestellte Hypothese. Dieser Einwand relativiert sich jedoch in dem Fall, daß die Phosphorylierung durch die PKA nur ein einzelnes Phosphat beinhaltet, dessen Fehlen die Laufhöhe eines Proteins nicht beeinflussen würde.

Die durchgeführten Aminosäureaustausche weiter im C-terminalen Bereich der APSES-Domäne (an Position L241, T248 und R262) haben ebenso wie die Austausche an Position T206 einen großen Einfluß auf die Efg1p-Aktivität, der sich hier jedoch in anderer Weise manifestiert. Die Morphologie von Zellen, die die Efg1-Varianten L241R, T248A, T248E oder R262L überexprimieren, ähnelt sehr stark der des *efg1*-Deletionsstammes, so daß als erste Hypothese bezüglich dieser Austausche eine vollkommen fehlende Expression der Efg1p-Derivate in Frage kam. Diese Annahme konnte allerdings durch den Nachweis eines 88 kDa großen Signals in der Western-Blot-Analyse schnell verworfen werden.

Bei den Austauschvarianten der Positionen L241, T248 und R262 tritt in der Regel die 90 und 92 kDa Modifikationen nicht auf; lediglich in Einzelfällen konnte ein schwaches Signal auch bei 90 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Keine dieser Efg1-Varianten zeigte jedoch irgendeine Aktivität im Hinblick der Regulation filamentösen Wachstums: Weder Pseudohyphen noch echte Hyphen wurden auf allen getesteten Medien aufgrund der Expression dieser Derivate beobachtet. Lediglich die Filamentbildung auf Chlamydosporeninduktionsmedium blieb unbeeinträchtigt, ohne daß jedoch die Ausbildung von Chlamydosporen beobachtet wurde.

Bei diesen Austauschvarianten handelt es sich also um Formen von Efg1p, die in der korrekten Größe gebildet werden, die jedoch weder die durch Phosphorylierung hervorgerufenen Modifikationen ausprägen, noch die Filamentbildung zu vermitteln in der Lage sind. Bezüg-

lich der Regulation des filamentösen Wachstums durch Efg1p lassen sich durch die Experimente mit diesen Varianten folgende Aussagen treffen:

1. Die Fähigkeit zur Regulation der Hyphen- und Pseudohyphenbildung läßt sich durch Austausch einzelner Aminosäuren in der bHLH-Domäne von Efg1p ausschalten.
2. Eine Phosphorylierung von Efg1p ist für die Steuerung des hyphalen und pseudohyphalen Wachstums notwendig.
3. Der Austausch der Aminosäuren in diesem Bereich der bHLH-Domäne betrifft nicht nur einzelne morphogenetische Prozesse (wie beim Austausch von T206), sondern Pseudohyphenbildung, hyphales Wachstum und Chlamydosporendifferenzierung,
4. Der Effekt des Austausches ist nicht von einer spezifischen Position (vgl. T206/T207) oder von der neu eingeführten Aminosäure (vgl. T206A/T206E) abhängig.

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch den Aminosäureaustausch im Bereich der Aminosäuren 241-262 nicht nur die Phosphorylierung einer Aminosäure betroffen ist, sondern generelle Prozesse, die die Aktivität von Efg1p bestimmen, gehemmt werden. Dafür spricht nicht nur der einheitliche Phänotyp der Austauschvarianten dieses Bereichs, sondern auch die Tatsache, daß der Defektphänotyp aufgrund des Austausches an Position T248 unabhängig davon ist, ob ein nichtphosphorylierbares Alanin oder das eine Phosphorylierung vortäuschende Glutamat eingefügt wird.

Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen ist eine Inhibierung eines allgemeinen Regulationsprozesses durch eine Konformationsänderung in Folge des Austausches. Diesen Regulationsprozess könnte der Kernimport von Efg1p darstellen, der vermutlich durch die basische Aminosäuresequenz RR..RGRR an Position 229-230/249-252 vermittelt wird. Die Aminosäureaustausche L241R, T248A/E und R262L liegen alle in dem betroffenen Bereich und stellen in jedem Fall einen Austausch dar, mit dem eine Konformationsänderung verbunden sein könnte. Leider ist es weder durch GFP-Fusionen der entsprechenden Varianten noch über Immunfluoreszenz gelungen, diese Hypothese *in vivo* zu bestätigen, da in beiden Fällen kein Signal beobachtet werden konnte. Dennoch erscheint diese Hypothese sinnvoll, da die Regulation von Proteinen über deren zelluläre Lokalisation ein verbreiteter Mechanismus ist. So wird beispielsweise für die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A in *S. cerevisiae*, Bcy1p ein Zusammenhang zwischen Kernlokalisierung, Phosphorylierungsstatus und regulatorischer Aktivität diskutiert (Griffioen *et al.*, 2001). Bezogen auf Efg1p sprechen die erhaltenen Daten für eine Aktivierung von Efg1p durch den Import in den Kern und die darauffolgende Phosphorylierung. Die experimentellen Ergebnisse aus dem Austausch einer potentiellen PKA-Zielsequenz deuten darüberhinaus auf eine Aktivierung durch PKA bei der Efg1p-vermittelten Hyphenbildung hin, während die Behandlung mit alkalischer Phosphatase sowie Antikörpern gegen Phospho-Threonin auf die Phosphorylierung durch eine oder mehrere andere Kinasen verweisen. Über die Auswirkung der zuletzt erwähnten Phosphorylierungen kann mit den zur Verfügung stehenden Daten nur spekuliert werden. Möglicherweise stehen die angenommenen weiteren Phosphorylierungen im Zusammenhang mit den durch den Austausch der PKA-Zielsequenz unbeeinflussten morphogenetischen Vorgängen, wie der Chlamydosporenbildung und dem pseudohyphalen Wachstum. Für diese verschiedenen Phosphorylierungen können mehrere hypothetische Punkte festgehalten werden, die zu einem Modell der Efg1p-vermittelten Regulation der Morphogenese führen:

Die PKA-Phosphorylierung findet vermutlich im Cytoplasma statt, da Untersuchungen in *S. cerevisiae* gezeigt haben, daß die aktiven katalytischen Untereinheiten der PKA dort zu finden sind (Griffioen *et al.*, 2000). Die mithilfe von alkalischer Phosphatase und Antikörpern gegen Phospho-Threonin gefundenen Phosphorylierungen treten wahrscheinlich nach einem Kern-

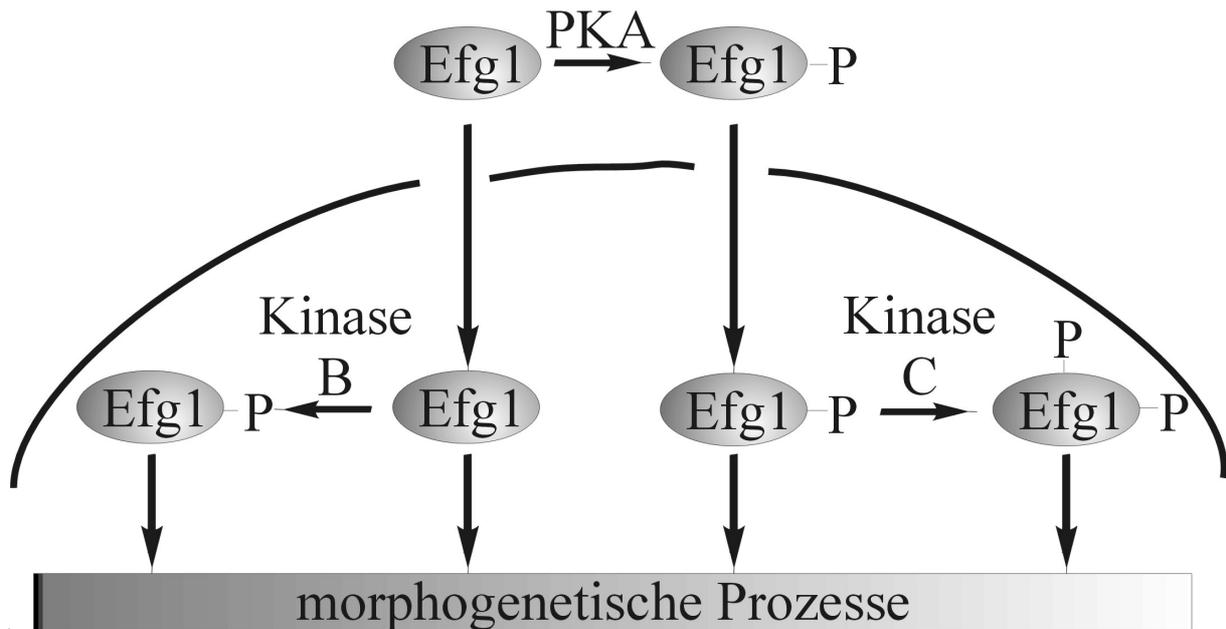


Abb. 4.3: Regulation morphogenetischer Prozesse durch differenzielle Phosphorylierung von Efg1p
Neben einer PKA-Phosphorylierung (wahrscheinlich im Cytoplasma) können weitere (vermutlich kernlokalisierte) Phosphorylierungen postuliert werden, die die Efg1-Aktivität determinieren. Dabei könnte eine Reihe von unterschiedlich phosphorylierten Efg1-Modifikationen entstehen, die für die Steuerung distinkter morphogenetischer Prozesse verantwortlich sind.

import auf. Letztere Phosphorylierungen führen zusammen mit der Phosphatübertragung durch die PKA zu multivalent phosphorylierten Formen von Efg1p, die entsprechend der Ausstattung mit Phosphatgruppen verschiedene morphogenetische Prozesse regulieren (Abb. 4.3).

Offen bleibt die Frage, welche Kinasen für die zusätzlichen Phosphorylierungen von Efg1p verantwortlich sind. Hier steht eine Reihe von Kandidaten zur Verfügung, für die ein Einfluß bei der Morphogenese nachgewiesen werden konnte. So konnten Chen *et al.* kürzlich das Gen für eine Zellzyklus-abhängige Kinase, *CRK1*, identifizieren, dessen Deletion eine verringerte Hyphenbildung und eine im Mausmodell verminderte Virulenz zur Folge hat (Chen *et al.*, 2000). Einen ähnlichen Effekt hat die Disruption dreier Gene für Histidin-Kinasen, *SLN1*, *NIK1* und *HK2* (Yamada-Okabe *et al.*, 1999), für die ebenfalls noch keine Zielproteine gefunden werden konnten. Da das dimorphe Wachstum sehr viele Umstellungen in der Zelle beinhaltet sind auch indirekte Beziehungen zu anderen zellulären Mechanismen denkbar. Beispielsweise beeinflusst eine Phosphatidylinositol-3-Kinase, die am vesikulären Transport beteiligt ist, gleichfalls die Adhäsion, die Hyphenbildung und die Virulenz von *C. albicans* (Bruckmann *et al.*, 2000).

Schließlich ergeben sich aus den Verhältnissen in *S. cerevisiae* einige Hinweise auf Kinasen, deren *C. albicans*-Homologe als mögliche Efg1p-Regulatoren fungieren könnten. Als Beispiel sei die Rim15-Proteinkinase genannt, die als stromabwärts der PKA liegende Komponente des cAMP-abhängigen Signalwegs in *S. cerevisiae* identifiziert wurde (Reinders *et al.*, 1998).

4.2.3 Der C-Terminus von Efg1p vermittelt pseudohyphales Wachstum bei Überexpression

Durch die Untersuchung C-terminal verkürzter Varianten von Efg1p sollte nachgewiesen werden, welchen Einfluß die Verkürzung auf die Regulation der Morphogenese von *C. albicans* hat. Die drei Varianten wurden so gewählt, daß jeweils ein wichtiges strukturelles Element von Efg1p durch die Verkürzung betroffen war. Das 188 AS große Derivat endet vor der bHLH-Domäne, das 308 AS große danach, und die 420 AS lange Variante schließt zusätzlich die C-terminale der beiden glutaminreichen Regionen von Efg1p ein (vgl. Abb 3.12 und 3.20). Im Western-Blot konnte lediglich die 420 AS-Variante nachgewiesen werden. Die beiden anderen Formen werden nicht exprimiert. Das Ausbleiben der Expression scheint bei Efg1p relativ leicht hervorrufbar zu sein. Dies belegen Experimente mit Varianten von Efg1p, in denen bereits der Austausch der drei Threoninreste an Position 206-208 zu Alanin eine Expression vollkommen verhindert (Bockmühl, 1998). Ohnehin sind mit der C-terminalen glutaminreichen Domäne und der bHLH-Domäne zwei Regionen betroffen, die vermutlich für grundsätzliche regulatorische Funktionen von Efg1p, wie Dimerbildung und DNA-Bindung, essentiell sind, so daß eine differenzierte Aussage über die Funktion dieser Bereiche mithilfe dieser Methode als nicht möglich zu erachten ist.

Im Gegensatz zu den beiden stark verkürzten Varianten wird die 420 AS-Form exprimiert. Erstaunlicherweise ist (analog zum unverkürzten Efg1p) sowohl die Differenz von berechneter zu beobachteter Größe als auch das Auftreten mehrerer Modifikationen erhalten geblieben. Die 420 AS große Variante scheint demnach noch phosphoryliert zu werden. Die Überexpression dieses Derivats ist nicht mehr in der Lage, pseudohyphales Wachstum zu vermitteln, hingegen zeigen die Kolonien aufgrund der Expression dieser Variante auf Spidermedium schwache Ansätze von Hyphenbildung. Mit dieser Variante von Efg1p liegt somit eine Form vor, die noch die Bildung echter Hyphen induzieren kann, während ihre Überexpression keine Pseudohyphen hervorruft. Dies bedeutet, daß der C-Terminus von Efg1p für die Ausprägung des Überexpressionsphänotyps, aber nicht für die Bildung von Hyphen verantwortlich ist.

4.2.4 Proteinkinase A und Efg1p regulieren die Hyphenbildung in einem gemeinsamen Signalweg

Zur Aufklärung der Anordnung regulatorischer Komponenten in einem Signaltransduktionsweg werden häufig epistatische Untersuchungen herangezogen. Unter der Annahme, daß der zu untersuchende Signalweg linear verläuft, kann man sich die Tatsache zunutze machen, daß viele regulatorische Proteine eine Basalaktivität unabhängig von einer Aktivierung durch einen stromaufwärts liegenden Faktor besitzen. Tritt nun durch Deletion einer Komponente des Signalweges ein Phänotyp auf, so kann dieser durch Überexpression eines stromabwärts liegenden Proteins komplementiert werden, während dies durch Überexpression eines stromaufwärts gelegenen Proteins nicht möglich ist. Im Falle von zwei parallelen Signalwegen, die einen ähnlichen regulatorischen Effekt haben, ist es häufig auch möglich, mittels einer Verstärkung des einen Weges (durch Überproduktion einer Komponente) den Defekt des anderen Weges zu komplementieren.

Nach diesem Muster wurde für die Regulation der Hyphenbildung eine Untersuchung zur Epistase durchgeführt, die speziell die Einordnung der Tpk-Isoformen und Efg1p in die Signaltransduktionswege zur Steuerung filamentösen Wachstums in *C. albicans* ermöglichen sollte. Wie aus Tabelle 3.1. ersichtlich wird, ergeben sich für die untersuchten Komponenten

folgende Zusammenhänge: Der Defekt eines *efg1*-Deletionsstammes kann nur durch *EFG1*- oder *RAS1*-Überexpression komplementiert werden, während der *cph1*-assoziierte Effekt sowohl durch *EFG1* als auch durch die Überexpression von *TPK1* und *TPK2* supprimiert werden kann. Die verminderte Hyphenbildung von *tpk1*- und *tpk2*- sowie von *cek1*-Deletionsstämmen kann hingegen durch alle getesteten Gene außer *RAS1* komplementiert werden. Diese Phänomene sprechen für zwei parallele Signalwege, wobei im einen Weg Cph1p durch Cek1p aktiviert wird, wohingegen im anderen Weg Efg1p stromabwärts von Tpk1p und Tpk2p liegt. Für Tpk1p, Tpk2p und Cek1p ist die Einordnung in parallele Wege durch die gegenseitige Komplementationsfähigkeit als sicher zu betrachten. Im Gegensatz dazu erscheint es seltsam, daß eine *efg1*-Deletion nicht durch eine *CPH1*-Überexpression supprimiert werden kann, obwohl beide Proteine am Ende paralleler Wege zu liegen scheinen. Dies mag sich aus der stärkeren Gewichtung des Efg1p-Signalweges für die Hyphenbildung auf Spidermedium erklären, die dem Cph1p-Signalweg eine Komplementation des Efg1p-Weges unmöglich macht. Der geringere Einfluß des MAPK-Weges manifestiert sich auch durch den nicht völlig afilamentösen Phänotyp der *cek1*- und *cph1*-Deletionen auf den meisten Induktionsmedien. Interessanterweise läßt sich *RAS1* nicht einfach als Faktor definieren, der sowohl die MAPK-Kaskade als auch den cAMP-Weg aktiviert, wie es bei *S. cerevisiae* der Fall zu sein scheint. Daß nur eine *EFG1*-Überexpression, nicht jedoch eine *CEK1*- oder *CPH1*-Überexpression den Hyphendefekt einer *ras1*-Deletion wiederherstellen kann, spricht für die starke Gewichtung des Efg1p-vermittelten Signals. Die Ras1p-abhängige Aktivierung scheint dabei nicht (oder nicht nur) über Tpk1p und Tpk2p zu verlaufen, da die Überexpression der TPK-Isoformen nicht zu einer Komplementation des *RAS1*-Defektes führt. Denkbar wäre eine Regulation über andere cAMP-abhängigen Kinasen. Bei der Beurteilung der Daten für *TPK1* und *TPK2* ist allerdings auch zu bedenken, daß eine *ras1*-Deletion eine Absenkung des cAMP-Spiegels bewirkt, so daß eine ausreichende Aktivität der PKA nicht unbedingt gewährleistet ist. Daneben muß es auch Efg1p-unabhängige Effekte von Ras1p auf die Hyphenbildung geben, da eine *efg1*-Deletion durch die Überexpression von *RAS1* komplementiert werden kann. Mit Gpa2p (der α -Untereinheit eines trimeren G-Proteins) wurden Experimente zur Regulation der Morphogenese in *C. albicans* durchgeführt, die im wesentlichen die Epistase-Untersuchungen unterstützen. In *S. cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, daß wie Ras2p auch Gpa2p auf die Adenylylzyklase wirkt und so den cAMP-Spiegel erhöht (Lorenz und Heitman, 1997). Die Deletion des *C. albicans*-Homologs zu *GPA2* bewirkt einen Hyphendefekt, der nicht durch die Überexpression von *CPH1* oder *EFG1* komplementiert werden kann (J. Perez-Martin, pers. Mitteilung). Gpa2p könnte also wie Ras1p neben Efg1p andere Zielproteine haben. In *S. cerevisiae* wird beispielsweise eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Kinase Sch9p durch Gpa2p diskutiert (Xue *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse sprechen für ein Modell einer vernetzten Regulation der Morphogenese, in dem die cAMP-abhängige Aktivierung von Efg1p eine zentrale Rolle einnimmt (Abb. 4.4).

Zur weiteren Bestätigung der Aktivierung von Efg1p durch Tpk1p und Tpk2p wurden zusätzliche epistatische Untersuchungen mit den Efg1-Varianten T206A und T206E durchgeführt (3.2.2.3) Dabei zeigte sich, daß lediglich das T206E-Derivat in der Lage war, die Hyphendefekte von Deletionsstämmen beider Signalwege zu komplementieren, während die Überexpression von T206A stets ohne Auswirkung blieb. Diese Daten verdeutlichen, daß eine nicht durch die Proteinkinase A phosphorylierbare Form von Efg1p ihre Fähigkeit zur Komplementation der Defekte in der Morphogenese verliert.

Mit Blick auf die Verhältnisse in *S. cerevisiae* ist die Einordnung von Efg1p stromabwärts der Proteinkinase A keineswegs unumstritten. Zwar gibt es Hinweise, daß die Überexpression des APSES-Proteins Sok2 in *S. cerevisiae* den Wachstumsdefekt eines Stammes mit erniedrigter PKA-Aktivität supprimiert (Ward *et al.*, 1995), doch gibt es auch Experimente, die gegen ein Modell sprechen, in dem Phd1p und Sok2p mit der Proteinkinase A im selben Weg agieren.

So stimuliert die *TPK2*-Überexpression die Pseudohyphenbildung im Wildtyp und in einem *phd1*-Deletionsstamm gleichermaßen (Pan und Heitman, 1999). Bei allen in *S. cerevisiae* durchgeführten Experimenten ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Pseudohyphenbildung das Objekt der Beobachtungen darstellte. Dieser Prozeß ist jedoch keineswegs mit der Induktion echter Hyphen in *C. albicans* vergleichbar, so daß die Regulationsmechanismen des filamentösen Wachstums in *S. cerevisiae* nur bedingt auf *C. albicans* übertragbar sind.

Obwohl die erhaltenen Daten für eine Regulation von Efg1p durch Tpk1p und Tpk2p sprechen, ist nicht auszuschließen, daß auch andere cAMP-abhängige Proteinkinasen an diesem Steuerungsmechanismus beteiligt sind. Ein potentielles *C. albicans*-Homolog zu Sch9p aus *S. cerevisiae* könnte eine derartige Aufgabe übernehmen. Diese Kinase wurde in der Bäckerhefe als Multikopiesuppressor eines PKA-bezogenen Wachstumsdefektes isoliert (Toda *et al.*, 1988) und besitzt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zur Proteinkinase A.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erlauben ein erweitertes Bild der Signalwege, die zu hyphalem Wachstum in *C. albicans* führen (Abb. 4.4). Dabei konnte die zentrale Rolle von Efg1p als Regulator der Morphogenese weiter belegt werden. Die Befunde aus den epistatischen Experimenten und den Untersuchungen an Efg1-Varianten mit veränderter PKA-Phosphorylierungssequenz sprechen in diesem Zusammenhang für eine Aktivierung von Efg1p durch die Proteinkinase A. Der Tatsache, daß es nicht gelungen ist, eine direkte Interaktion von Efg1p und Tpk1p bzw. Tpk2p nachzuweisen, ist dabei keine allzu große Bedeutung beizumessen, da Interaktionsnachweise von vielen Faktoren abhängen. So könnte beispielsweise die geringe Interaktionsdauer diesen Nachweis unmöglich machen. Ebenso ist es nicht unwahrscheinlich, daß die für das Zwei-Hybrid-System verwendeten Fusionsproteine aufgrund veränderter Konformationen nicht mehr zur Interaktion befähigt sind.

Die Regulation durch die Proteinkinase A scheint besonders für die Hyphenbildung auf Spidermedium wichtig zu sein, während bei der Induktion durch Serum auch andere Regulationsmechanismen auf Efg1p wirken dürften, da der Einfluß der potentiellen PKA-Phosphorylierungssequenz bei der serumvermittelten Hyphenbildung nicht so stark ausgeprägt ist.

Die Chlamydosporeninduktion erfolgt unabhängig vom Status des Threonin der PKA-Konsensussequenz an Position 206, ist jedoch bei Efg1-Varianten, die keine Phosphorylie-

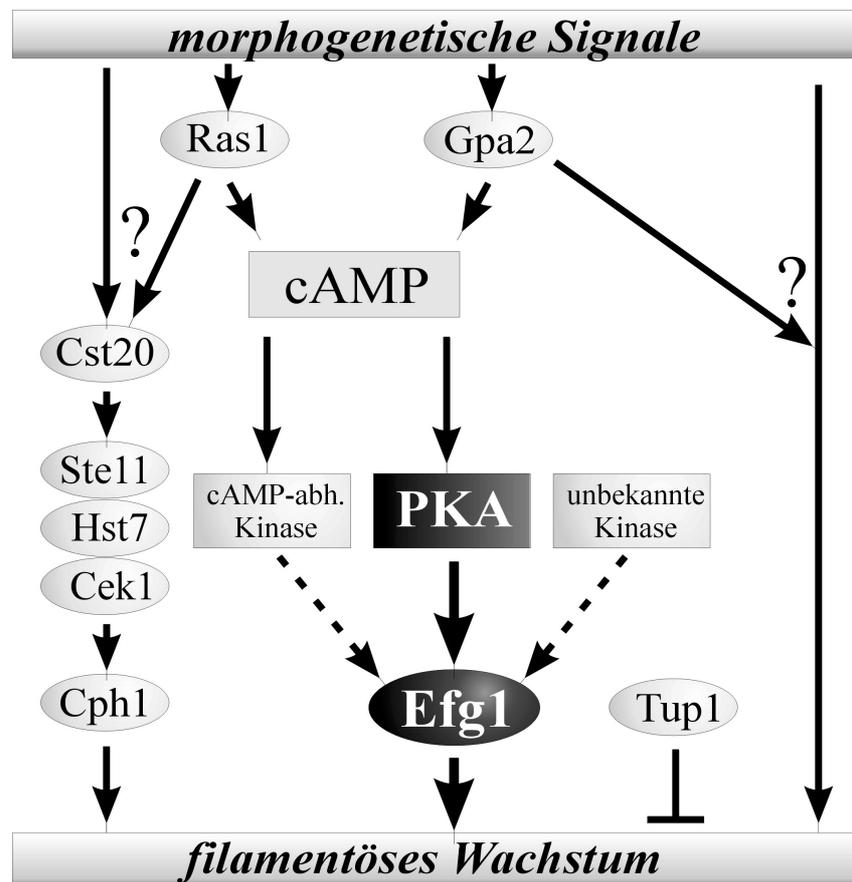


Abb. 4.4: Regulation der Morphogenese in *C. albicans*

rungen aufweisen, gehemmt, so daß vermutlich andere Aktivatoren bei der Differenzierung von Chlamydosporen auf Efg1p wirken. Möglicherweise ist der Defekt in der Chlamydosporenbildung bei den Efg1-Varianten L241R, T248E und R262L auch auf allgemeine Defekte (wie eine fehlende Kernlokalisierung) zurückzuführen und nicht primär von einer Phosphorylierung abhängig. Das filamentöse Wachstum unter chlamydosporeneninduzierenden Bedingungen, das auch bei *efg1*-Deletionsstämmen zu beobachten ist, deutet in jedem Fall auf einen Efg1-unabhängigen Weg der Hyphenbildung hin, der durch Sauerstoffmangel induziert sein könnte. Einige Untersuchungen verweisen auf die Beteiligung eines weiteren Transkriptionsfaktors, Czf1p, dessen Überproduktion nur unter anaeroben Bedingungen die Hyphenbildung stimuliert (Brown *et al.*, 1999).

Schließlich konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß durch *EFG1*-Überexpression die Pseudohyphenbildung unabhängig von einer PKA-Phosphorylierung, jedoch nur mithilfe eines kompletten C-Terminus' von Efg1p induziert werden kann.

Vermutlich wird Efg1p also durch eine Reihe von Faktoren hinsichtlich seiner vielfältigen regulatorischen Funktionen beeinflusst. Dabei sind die unterschiedlichen morphologischen Effekte nicht allein durch eine Efg1-Aktivierung *per se* zu erklären, sondern sind Auswirkungen spezifischer Funktionen, die differenziert gesteuert werden können. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß durch verschiedene Eingriffe in die Proteinsequenz von Efg1p die Pseudohyphenbildung oder die Hyphenbildung unabhängig voneinander unterdrückt werden können. Dies legt den Schluß nahe, daß es sich nicht lediglich um zwei Spielarten desselben Phänomens, sondern um eigenständige Ausprägungen filamentöser Morphologien handelt. Zu berücksichtigen ist ferner, daß die Vielzahl von Efg1p-Effekten nicht nur über die Funktion als Aktivator vermittelt werden muß. Vielmehr könnte Efg1p als bHLH-Protein durch die Dimerisierung mit unterschiedlichen Partnern eine ambivalente Rolle als Transkriptionsaktivator und –repressor übernehmen. Neben der bereits erwähnten Regulation durch das bHLH-Protein Myc, das in Säugern (je nach Dimerisierungspartner) sowohl aktivierende als auch reprimierende Wirkungen zeigt (Blackwood und Eisenman, 1991; Shrivastava *et al.*, 1996; Peukert *et al.*, 1997), konnte kürzlich auch für das APSES-Protein Sok2 aus *S. cerevisiae* gezeigt werden, daß es einerseits als positiver Regulator der Mitose, andererseits aber als negativer Regulator der Meiose wirkt (Shenhar und Kassir, 2001).

4.2.5 Efg1p ist an der Steuerung der Uridinaufnahme beteiligt

Die Synthese von Pyrimidinbasen ist entscheidend für die Lebensfähigkeit von *C. albicans* und stellt damit einen potentiellen Virulenzfaktor dar (Kirsch und Whitney, 1991). Durch Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem ³H-Uridin konnte gezeigt werden, daß Efg1p einen negativen Einfluß auf die Uridinaufnahme besitzt.

Stämme, in denen *EFG1* deletiert wurde, weisen eine um den Faktor zehn höhere Uridinaufnahmerate auf als der Wildtyp oder ein *cph1*-Deletionsstamm (Abb. 3.28). Dieser Effekt kann jedoch nur beobachtet werden, wenn die Zellen zuvor in uridinfreiem Medium angezogen wurden. Gibt man hingegen Uridin in das Medium der Vorkulturen, so zeigen *efg1*-Deletionsstämmen keine signifikante Erhöhung der Uridinaufnahme. Efg1p könnte demnach als Repressor die Transkription eines Uridintransporters hemmen, so daß zum Zeitpunkt der Messung im Wildtyp nur wenig Uridin aufgenommen wird, während der *efg1*-Deletionsstamm durch die Überverfügbarkeit an Uridintransportern mehr Uridin aufnehmen kann, um schneller die optimale Uridinkonzentration zu erreichen. Wurden die Zellen bereits längere Zeit in uridinhaltigem Medium angezogen, wird hingegen eine Situation eingetreten sein, die auch im Wildtyp die Expression von Uridintransportern ermöglicht. Zum Zeitpunkt der Messung befindet sich der Uridinhaushalt gewissermaßen im Gleichgewicht, so daß –

unabhängig von einer Efg1-Aktivität - nur in geringem Maße Uridin in die Zelle transportiert wird. In umgekehrter Weise könnte Efg1p aber auch einen positiven Einfluß auf den Export von Uridin ausüben, so daß das gleiche Phänomen zu beobachten wäre.

Über die Pyrimidintransporter in *C. albicans* ist bislang wenig bekannt. Zwar wurden durch biochemische Methoden Hinweise auf eine Uridinpermease in *C. albicans* gefunden (Fasoli und Kerridge, 1990), allerdings konnte bisher nur ein Gen (*NUPI*) für einen Nukleosidtransporter kloniert werden, der Adenosin und Guanosin, nicht jedoch Uridin transportiert (Detke, 1998).

Um sicherzugehen, daß der Phänotyp der *efg1*-Deletion nicht auf einen allgemeinen Effekt, beispielsweise eine erhöhte Membranpermeabilität zurückzuführen ist, wurde die Glukoseaufnahme im *efg1*-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp und zu *cph1*-Nullmutanten gemessen (Abb. 3.30). Dabei erwies sich die intrazelluläre Glukosekonzentration als durch die Deletionen unbeeinflusst. Allerdings lagen die für die *cph1*-, *efg1*- und *cph1/efg1*-Deletionsstämme gemessenen Werte insgesamt etwas niedriger als im Wildtypstamm. Wodurch diese Wirkung auf die Glukosekonzentration hervorgerufen wird, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen; wichtig ist jedoch, daß die Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme anders geartet sind, als jene auf die Uridinaufnahme. Somit kann ein spezifischer Einfluß von Efg1p auf den Uridintransport angenommen werden.

Bemerkenswerterweise hat die Expression der T206A-Austauschvariante von Efg1p ebenso eine Erhöhung der Uridinaufnahmerate zur Folge, wie das Fehlen der Efg1p-Expression, während sich durch Expression des Efg1-Wildtypproteins dieser Effekt unterdrücken läßt (Abb. 3.29). Dies deutet auf eine Beteiligung der PKA-Phosphorylierung auch bei der Efg1-vermittelten Regulation der Uridinaufnahme hin.

Der negative Einfluß auf den Uridintransport, wahrscheinlich über die Repression des Gens für eine Uridinpermease, ist ein weiteres Ziel für die Efg1-abhängige Regulation zellulärer Prozesse. Im Gegensatz zu den bisher charakterisierten Funktionen von Efg1p stellt die Steuerung der Uridinaufnahme keinen primär morphologisch relevanten Prozeß dar. Diese Tatsache gibt Anlaß zu der Annahme, daß Efg1p in *C. albicans* nicht nur als Regulator der Morphogenese agiert, sondern ein breiteres Spektrum an Vorgängen in der Zelle steuert als bislang angenommen.

4.3 Identifikation des Efg1p-Homologs Efh1p

Die morphogenetische Differenzierung bei Pilzen beinhaltet nicht nur die Möglichkeit zu filamentösem Wachstum, sondern umfaßt vielmehr eine Reihe von Vorgängen, mit denen sich die einzelnen Spezies an ihre Umwelt angepaßt haben. Ungeachtet der Unterschiede existiert mit den APSES-Proteinen eine homogene Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in Pilzen die verschiedenartigen Differenzierungsvorgänge steuern. In *Neurospora crassa* wird die Sporenreifung durch Asm1p reguliert (Aramayo *et al.*, 1996), während es in *Aspergillus nidulans* die Konidiophorenbildung ist, an deren Regulation ein APSES-Protein, StuAp, beteiligt ist (Miller *et al.*, 1992).

Zu den bereits früh identifizierten Mitgliedern der APSES-Familie zählen Phd1p und Sok2p aus *S. cerevisiae*, die in antagonistischer Weise die Pseudohyphenbildung beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, daß die Deletion von *SOK2* ebenso wie die Überexpression von *PHD1* die Bildung von Pseudohyphen verstärkt (Ward *et al.*, 1995; Gimeno und Fink, 1994).

4.3.1 Efh1p ist neben Efg1p das zweite APSES-Protein aus *C. albicans*

Mit der Identifikation von Efh1p ist es gelungen, ebenso wie in *S. cerevisiae*, auch in *C. albicans* die Existenz von zwei APSES-Proteinen nachzuweisen. Dabei läßt die hohe Homologie innerhalb der konservierten APSES-Domäne keinen Zweifel daran, daß Efh1p dieser Proteinfamilie zuzuordnen ist. In dem etwa 100 AS umfassenden Bereich der APSES-Region ist die Proteinsequenz von Efh1p zu über 65% mit der Sequenz der anderen bekannten APSES-Proteine identisch.

Allerdings beschränkt sich die Homologie ausschließlich auf diesen Bereich, wie Abb. 3.32 zeigt. Lediglich das Auftreten von glutaminreichen Regionen, wie sie auch bei Efg1p und Sok2p vorkommen, stellt ein weiteres gemeinsames Merkmal einiger APSES-Proteine dar, das für Transkriptionfaktoren typisch ist. Die Länge der APSES-Proteine aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* differiert erheblich. Sok2p und Efh1p stellen mit 785 bzw. 720 AS die größten Vertreter, Efg1p besteht aus 552 AS, während Phd1p mit 336 AS ausgesprochen klein ist.

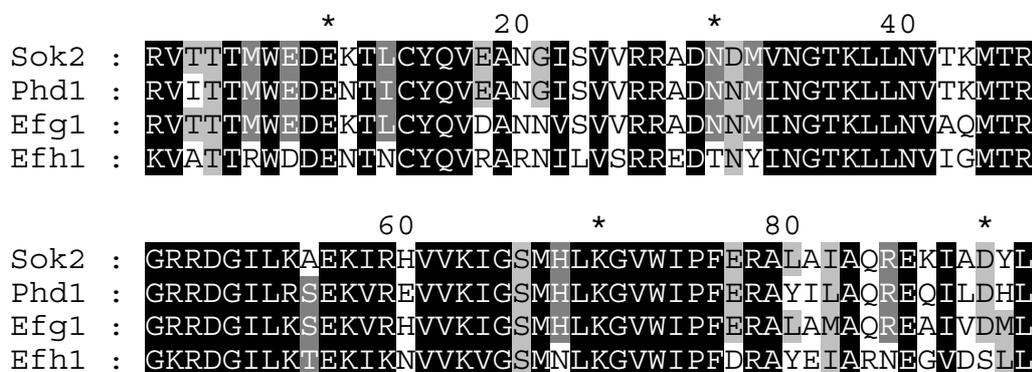


Abb. 4.5: Vergleich der APSES-Domänen von Sok2p, Phd1p, Efg1p und Efh1p

Für die nicht bei allen Vertretern identischen Aminosäuren innerhalb der APSES-Domäne sind einige Besonderheiten herauszustellen. So existiert die potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle in Form der Sequenz RVT außer bei Efg1p nur bei Sok2p, StuAp und Asm1p. Dagegen ist das phosphorylierbare Threonin bei Efh1p und Phd1p durch eine nicht-phosphorylierbare aliphatische Aminosäure ersetzt. Für Sok2p wird allerdings auch die Beteiligung einer anderen PKA-Zielsequenz an T598 diskutiert, die C-terminal der APSES-Domäne lokalisiert ist (Shenhar und Kassir, 2001). Interessant bei einem Vergleich der APSES-Domänen von Phd1p und Sok2p sowie Efg1p und Efh1p ist die Frage, ob sich aufgrund übereinstimmender Aminosäuresequenzen Rückschlüsse auf analoge Funktionen ergeben. Dies läßt sich allerdings nur schwer beurteilen. Als gemeinsames *C. albicans*-Merkmal wäre das in Abb. 4.5 an Position 21 befindliche Asparagin zu nennen, das bei den APSES-Proteinen anderer Pilze als Glycin konserviert ist. Zwischen Efh1p und Phd1p besteht in der Existenz eines Tyrosinrestes an Position 80 eine Gemeinsamkeit. Diese potentielle Phosphorylierungsstelle ist bei Sok2p und Efg1p nicht vorhanden.

4.3.2 Efh1p ist in die Regulation filamentösen Wachstums involviert

Die Überexpression von *EFH1* resultiert wie die von *EFG1* in pseudohyphalem Wachstum. Dabei zeigten sich die für *C. albicans* typischen Pseudohyphen mit stark elongierten Zellen. Bei *S. cerevisiae* tritt dieser spezielle Phänotyp nicht auf; hier zeigen die Zellen eine pseudohyphale Morphologie, die eher dem *efg1*-Deletionsphänotyp entspricht. Es konnte bislang nicht endgültig geklärt werden, ob die beiden Arten von Pseudohyphen bei *C. albicans* die gleiche Morphologie repräsentieren, oder ob zwei unterschiedliche Wachstumsformen vorliegen, die lediglich Gemeinsamkeiten aufweisen.

In jedem Fall spricht das Efh1p-induzierte Auftreten von Pseudohyphen, die denen gleichen, welche durch *EFG1*-Überexpression hervorgerufen werden können, für eine regulatorische Funktion dieses Proteins beim filamentösen Wachstum von *C. albicans*. Dabei dürfte die Existenz einer APSES-Domäne für die Hervorbringung dieses Überexpressionsphänotyps alleine nicht ausreichend sein, denn die APSES-Proteine aus *S. cerevisiae* haben ungeachtet ihres gemeinsamen Merkmals antagonistische Funktionen bei der Pseudohyphenbildung. Vielmehr scheint der C-Terminus von Efg1p in die Regulation pseudohyphalen Wachstums involviert zu sein (siehe 4.2.3). In diesem Bereich existieren einige homologe Motive zu Efh1p, die für den übereinstimmenden Überexpressionsphänotyp verantwortlich sein könnten (vgl. Abb. 3.34).

Im Gegensatz zu *EFG1* kann der Hyphendefekt von morphogenetisch relevanten Deletionsstämmen nicht durch die Überexpression von *EFH1* supprimiert werden. Dies spricht nicht nur für eine grundsätzlich verschiedene Regulation von hyphalem und pseudohyphalem Wachstum, sondern auch für eine unterschiedliche Funktion von Efh1p und Efg1p in der Kontrolle der Morphogenese.

4.3.3 Efh1p bildet Homodimere

APSES-Proteine besitzen mit der bHLH-Domäne eine Region, die sie nicht nur zur DNA-Bindung befähigt, sondern auch zur Bildung von Dimeren mit anderen bHLH-Proteinen. Häufig entscheidet dabei der Dimerisierungspartner über die regulatorische Funktion eines bHLH-Proteins. Ein gut untersuchtes Beispiel stellt die Dimerbildung von Myc und Max in Säugerzellen dar. Max/Max Homodimere wirken als Repressoren der Transkription, da Max keine eigene Aktivierungsdomäne besitzt (Ayer und Eisenmann, 1993). Bei der Zellproliferation kommt es zu einer Erhöhung des zellulären Spiegels von Myc, das in einem kompetitiven Mechanismus Max aus den Homodimeren verdrängen kann, so daß Myc/Max-Heterodimere gebildet werden (Blackwood und Eisenmann, 1991). Diese binden an die gleiche Sequenz wie Max/Max-Homodimere, allerdings mit höherer Affinität. Während das Myc/Max-Heterodimer als Transkriptionsaktivator fungiert, bewirkt die Dimerisierung von Myc mit anderen Partnern eine Repression von Genen, die die Zelldifferenzierung fördern (Shristava *et al.*, 1996; Peukert *et al.*, 1997). Dabei inhibiert die direkte Bindung von Dimerisierungspartnern an die Aktivierungsdomäne von Myc dessen aktivierende Eigenschaft (Bouchard *et al.*, 1998).

Eine Möglichkeit besteht im Falle von *C. albicans* darin, daß –analog zu Myc und Max – die APSES-Proteine untereinander Dimere bilden und somit ihre zelluläre Aufgaben erfüllen. Aus diesem Grund wurde in Zwei-Hybrid-Experimenten die Interaktion von Efg1p und Efh1p untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte zwar keine Heterodimerbildung von Efg1p und Efh1p festgestellt werden, doch sprechen die erhaltenen Daten für eine Homodimerisierung von Efh1p.

Die Feststellung, daß bereits die Fusion von *EFH1* an die Gal4-Bindedomäne eine transkriptionelle Aktivierung zur Folge hat, deutet auf die Existenz einer Aktivierungsdomäne bei Efh1p hin. Gleichzeitig erschwert dieser Umstand die Beurteilung der Zwei-Hybrid-Analyse, da eine Aktivierung der Reportergene bereits ohne die Interaktion mit einem Partner erfolgt. Aus diesem Grund konnte auch nur mithilfe der Aktivierung des *ADE2*-Gens die Homodimerisierung von Efh1p nachgewiesen werden (Abb. 3.35). In dem verwendeten System ist es möglich, die Reporteraktivierung getrennt voneinander zu betrachten, weil diese über drei verschiedene Promotoren reguliert werden, die natürlich spezifisch auf eine Aktivierung durch ein interaktionsbedingtes Dimer reagieren. Anders als in Systemen, in denen nur ein Promotor zur Kontrolle der Reportergene benutzt wird, spricht das negative Ergebnis der *HIS3*- und *lacZ*-Reporter in diesem Fall nicht prinzipiell gegen eine Homodimerbildung von Efh1p. Es bleibt jedoch die Frage, warum eine Fusion von *EFG1* mit der Bindedomäne nicht ebenfalls eine Aktivierung der Reportergene verursacht, da aufgrund des gleichen Überexpressionsphänotyps eine ähnliche Wirkungsweise von Efh1p und Efg1p angenommen werden muß. Möglicherweise spielt dabei die Abschirmung der Aktivierungsdomäne durch Konformationsänderungen eine Rolle, die durch die Fusion mit der Bindedomäne hervorgerufen werden. Bedingt durch die Größe könnten diese Umstände – vielleicht aufgrund der räumlichen Entfernung – bei Efh1p vernachlässigbar sein.

5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit, zwischen einzelliger Hefeform und filamentösen Morphologien zu wechseln, spielt eine wichtige Rolle bei der Ausprägung lebensbedrohlicher systemischer Candidosen. Dieser Dimorphismus ermöglicht es *C. albicans*, als filamentöse Struktur an Zelloberflächen zu adhären und diese zu durchwachsen, während als Hefe eine schnelle Verbreitung über den Blutstrom gewährleistet ist. Als zentraler Regulator der Morphogenese fungiert der Transkriptionsfaktor Efg1p, der für die Hyphenbildung unter den meisten Induktionsbedingungen essentiell ist. Mehrere Hinweise sprechen für eine Einordnung von Efg1p in einen Signaltransduktionsweg, der der Kontrolle durch die cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) unterliegt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nach CaTpk2p eine zweite katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, CaTpk1p, charakterisiert und ihre Bedeutung für die Steuerung des filamentösen Wachstums in *C. albicans* herausgestellt. Mithilfe von Sequenzanalysen und *TPK*-Deletionsstämmen konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu den drei Tpk-Isoformen bei *Saccharomyces cerevisiae* in *C. albicans* nur zwei katalytische PKA-Untereinheiten existieren, die gemeinsam das Wachstum und die zelluläre Streßantwort regulieren, während sie auf die Hyphenmorphogenese in unterschiedlicher Weise wirken. So wird die Expression von *CaTPK1* hauptsächlich für die Hyphenbildung auf festen Induktionsmedien benötigt. Dagegen ist *CaTPK2* wichtig für die Ausprägung von Keimschläuchen in flüssigen Medien und für das invasive Wachstum.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die Funktion von Efg1p als Regulator der Hyphenbildung von einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase A bestimmt wird. Durch Aminosäureaustausch erzeugte Varianten von Efg1p zeigten eine veränderte Hypheninduktion in Abhängigkeit von einem vorgetäuschten Phosphorylierungsstatus einer PKA-Zielsequenz. Die Substitution eines Glutamatrestes anstelle des Threoninrestes an Position 206 generierte eine hyperaktive Form von Efg1p, deren Expression nicht nur die Hyphenbildung zu stimulieren vermochte, sondern auch den Hyphendefekt von *tpk*-Deletionsstämmen komplementierte. Dagegen hatte die Einführung eines nichtmodifizierbaren Alaninrestes anstelle des Threonins den Verlust der morphogenetischen Aktivität zur Folge. Dieser Austausch führte nicht nur zu einer verringerten Hyphenbildung, sondern auch zur Einbuße der Fähigkeit zur Suppression filamentöser Defekte, während die Induktion von Pseudohyphen unbeeinträchtigt blieb.

Durch gezielte Austausche anderer Aminosäuren sowie der sequentiellen Verkürzung von Efg1p wurde gezeigt, daß neben der Proteinkinase A noch andere Kinasen an der Regulation dieses Transkriptionsfaktors beteiligt sein müssen. In diesem Zusammenhang konnte mithilfe alkalischer Phosphatase und Antikörpern gegen Phospho-Threonin biochemisch nachgewiesen werden, daß Efg1p ein Phosphoprotein ist. Die gewonnenen Erkenntnisse sprechen für ein Modell, indem Efg1p mehrere, durch verschiedene Kinasen vermittelte Phosphorylierungsstufen annehmen kann, die die unterschiedlichen Funktionen von Efg1p determinieren. Dabei konnte neben der Kontrolle morphogenetischer Prozesse, wie der Hyphenbildung, dem pseudohyphalen Wachstum und der Differenzierung von Chlamydosporen, in dieser Arbeit eine Beteiligung von Efg1p bei der Uridinaufnahme herausgestellt werden.

Mit der Klonierung und Sequenzierung von *EFH1* ist es gelungen, das Gen für einen potentiellen Regulator des Dimorphismus zu identifizieren. Die durchgeführten Sequenzvergleiche weisen Efh1p wie Efg1p als Mitglied einer Familie von bHLH-Proteinen aus, die in Pilzen an der Steuerung der Morphogenese beteiligt sind. Die Überexpression von *EFH1* löst ebenso wie die von *EFG1* die Bildung von Pseudohyphen aus. Außerdem deuten weitere experimentelle Daten auf eine Homodimerbildung von Efh1p hin, wie sie für bHLH-Proteine typisch ist.

6 Literaturverzeichnis

Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. und Heitman, J. (1997)

Cryptococcus neoformans mating and virulence are regulated by the g-Protein α subunit *GPA1* and cAMP. *Genes Developm.* 11: 3206-3217

Alspaugh, J.A., Cavallo, L.M., Perfect, J.R. und Heitman, J. (2000)

RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 36: 352-365

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990)

Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410

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 Metzner, 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

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

Banuett, F. (1998)

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

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

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

Birse, E.C., Irwin, M.Y., Fonzi, W.A. und Sypherd, P.S. (1993)

Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 61: 3648-3655

Bisson, L.F. und Fraenkel, D.G. (1983)

Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80: 1730-1734

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

Bockmühl, D. (1998)

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

Boguslawski, G. (1992)

PBS2, a yeast gene encoding a putative protein kinase, interacts with the RAS2 pathway and affects osmotic sensitivity of *S. cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 138: 2425-2432

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

Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M. und Neeser, J.R. (1991)

In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha-1-2Gal beta bearing complex carbohydrates. Infect. Immun. 59: 1605-1613

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

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

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

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

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 *CZFI* 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

Bulawa, C.E., Miller, D.W., Henry, L.K. und Becker, J.M. (1995)

Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 10570-10574

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

Regulatory squelching. FEBS 344: 105-108

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

Casal, M. und Linares, M.J. (1981)

The comparison of six media for chlamydospore induction by *Candida albicans*. Mycopathologia 76: 125-128

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., Röllinghoff, M., Dignard, D., Thomas, D.Y. und White-way, M. (1997)

Derepressed Hyphal Growth and Reduced Virulence in a VH1 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 White-way, M. (1998)

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

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

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

Detke, S. (1998)

Cloning of the *Candida albicans* nucleoside transporter by complementation of nucleoside transport-deficient *Saccharomyces*. Yeast 14: 1257-1265

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.

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

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. (2000)

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

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

Fasoli, M.O. und Kerridge, D. (1990)

Uptake of pyrimidines and their derivatives into *Candida glabrata* and *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 136: 1475-1481

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

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

Fields, S. und Song, O. (1989)

A novel genetic system to detect protein-protein interaction. Nature 340: 245-246

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

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

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

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

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

Gold, S., Duncan, Gillian, Barrett, K. und Kronstad, J. (1994)

cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev.* **8**: 2805-2816

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

Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M. D. und Ruis, H. (2000)

Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 1449-1456

- Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, A., Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M. D. und Ruis, H. (2001)**
Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol. Cell. Biol.* 21: 511-523
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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 In *Mobile DNA*. Seite 763-782; Herausg. Berg, D.E. und Howe, M.M., Washington, DC: American Society for Microbiology
- 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

James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996)

Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436

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

Joshi, K.R., Solanki, A. und Pankrash, P. (1993)

Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and on corn meal agar with or without Tween-80. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 36: 48-52

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

Kirsch, D.R. und Whitney, R.R. (1991)

Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect. Immun.* 59: 3297-3300

Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.-H., Taylor, S. und Sowadski, J.M. (1991)

Crystal Structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein-kinase. *Science* 253: 407-414

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

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

Krems, B., Charizanis, C. und Entian, K.-D. (1995)

Mutans of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr Genet.* 27: 427-434

Kron, S.J. (1997)

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

Kronstadt, J., De Maria, A., Funnell, D., Laidlaw, R.D., Lee, N., de Sá, M.M. und Ramesh, M. (1998)

Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch. Microbiol.* 170: 395-404

Kübler, E., Mösch, H.U., Rupp, S. und Lisanti, M.P. (1997)

Gpa2p, a G-Protein α -Subunit, Regulates Growth and Pseudohyphal Development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 272: 20321-20323

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

Kwon-Chung, K.J. und Bennett, J.E. (1978)

Distribution of α and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* 108: 337-340

Laemmli, U.K. (1979)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-686

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

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

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

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

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 J.* 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 construction of *MTLa* and *MTL α* strains. *Science* 289: 310-313

Marchler, G., Schüller C., Adam, G. und Ruis, H. (1993)

A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12: 1997-2003

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

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 5FOA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 607-608

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

Mitchell, T. und Dean, R.A. (1995)

The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 7: 1869-1878

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

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

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

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 *MKCI* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* 144: 411-424

Nehlin, J.O. und Ronne, H. (1990)

Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilm's tumour finger proteins. *EMBO J.* 9: 2891-2898

Niimi, M. (1996)

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

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

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

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

Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988)

Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85; 2444-2448

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

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

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

Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E., Thai, T.C. und Saito, H. (1996)

Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK2* „two-component“ osmosensor. *Cell* 86: 865-875

Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E.M., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. und Jones, E.W. (1989)

Fluorescence microscopy methods for yeast. *Meth. Cell. Biol.* 31: 357-435

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

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. USA 97: 5984-5988

Rotrosen, D., Edwards, J.E., Gibson, T.R., Moore, J.C., Cohen, A.H. und Green, I. (1985)

Adherence of *Candida* to Cultured Vascular Endothelial Cells: Mechanisms of Attachment and Endothelial Cell Penetration. J. of Infectious Diseases 152: 1264-1274

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

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

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

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

Schüller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. und Ruis, H. (1994)

The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. EMBO J. 13:4382-4389

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

Shulewitz, M.J., Inouye, C.J. und Thorner, J. (1999)

Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 19: 7123-7137

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., Morrow, B. und Srikantha, T. (1993)

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

Sonneborn, A. (1999)

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

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

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

Southern, E.M. (1975)

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

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., Tsai, L.K., 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

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.

Sundstrom, P. (1999)

Adhesins in *Candida albicans*. Curr. Opin. Microbiol. 2: 353-357

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

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

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997)

The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Ac. Res.* 24: 4876-4882

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

Vazquez-Torres, A. und Balish, E. (1997)

Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 170-192

Vieira, J und Messing, J. (1991)

New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* 100: 189-194

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

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

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

Yaar, L., Mevarech, M. und Koltin, Y. (1997)

A *Candida albicans* RAS-related gene (*CaRSR1*) is involved in budding, cell morphogenesis and hypha development. *Microbiology* **143**: 3033-3044

Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M. und Yamada-Okabe, H. (1999)

Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**: 7243-7247

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

7 Abkürzungsverzeichnis

7.1 Allgemeine Abkürzungen

A	Adenin;	FOA	5'-Fluororotidinsäure (engl. "5'-fluoroorotic acid")
Abb.	Abbildung	g	Gramm
Amp	Ampicillin	G	Guanin
AP	Alkalische Phosphatase	Gal	Galaktose
APS	Ammoniumperoxodisulfat	β -Gal	β -Galaktosidase
APSES	pilzspezifische bHLH-Domäne	GlcNAc	N-Acetylglukosamin
ARS	Autonom replizierende Sequenz	GTP	Guanosintriphosphat
AS	Aminosäure	HA	Hämagglutinin
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Domäne	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
bp	Basenpaare	<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. „bovine serum albumine“)	kb	Kilobasenpaare
bzw.	beziehungsweise	kDa	Kilodalton
C	Cytosin	LAC4	β -Galaktosidase-Gen aus <i>K. lactis</i>
°C	Temperatur in Grad Celsius	lacZ	β -Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>
Ca	<i>Candida albicans</i>	log	logarithmisch
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	M	Molar
CASA	Casaminosäuren	μ	mikro
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	MAPK	<u>M</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
CEN	Centromer	<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
Ci	Curie	min	Minute
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	ml	Milliliter
C-Quelle	Kohlenstoffquelle	mM	Millimolar
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	MOPS	[3-(N-Morpholinopropan-Sulfonsäure)]
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
DIG	Digoxigenin	NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
DMSO	Dimethylsulfoxid	nm	Nanometer
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „desoxyribonucleic acid“)	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600\text{nm}$
cdNA	komplementäre DNA (engl. „complementary DNA“)	³² P	Phosphorisotop
DTT	1,4-Dithiothreitol	PAA	Polyacrylamid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PBS	Phosphatpuffer (engl. „phosphate buffered saline“)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	<i>PCK1p</i>	<i>PCK1</i> -Promotor
FRE	filamentous responsive element (engl.)		

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. „polymerase chain re- action“)	T	Thymidin
PEG	Polyethylenglykol	Tab.	Tabelle
pH	negativer dekadischer Log- arithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration	TE	Tris-EDTA
PKA	Proteinkinase A	TEMED	N, N, N', N'- Tetramethyldiamin
POD	Peroxidase	Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminoethan
PRE	pheromone responsive ele- ment (engl.)	u.a.	unter anderem
RNA	Ribonukleinsäure (engl. „ribonucleic acid“)	<i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
RNase	RibonukleaseA	upm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe	URA	Uracil
³⁵ S	Schwefelisotop	UV	ultraviolettes Licht
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vgl.	vergleiche
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X-Gal	5-Brom-4Chlor-3-Indolyl-β- D-Galaktopyranosid
s.o.	siehe oben	YNB	Yeast nitrogen base (Hefe Stickstoff Basis)
SD	synthetisches Minimal- medium mit Glukose	YPD	Yeast extract-Pepton- Dextrose (Vollmedium)
SDS	Natriumdodecylsulfat	z.B.	zum Beispiel
SGal	synthetisches Minimal- medium mit Galaktose		
SLADH	Synthetisches Medium mit geringer Ammonium Menge		
STRE	stress responsive element (engl.)		

7.2 Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren

A	Ade	Adenin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Iso	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht, bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Anja Sonneborn, Dirk P. Bockmühl und Joachim F. Ernst (1999)

Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator.
Infection and Immunity 67: 5514-5517

**Anja Sonneborn, Dirk P. Bockmühl, Michaela Gerads, Katharina Kurpanek,
Dominique Sanglard und Joachim F. Ernst (2000)**

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

Dirk P. Bockmühl und Joachim F. Ernst (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

**Dirk P. Bockmühl, Shankarling Krishnamurthy, Michaela Gerads, Anja Sonneborn,
Bernd Tebarth und Joachim F. Ernst**

Both protein kinase A isoforms, Tpk1p and Tpk2p, share functions in growth, but have distinct roles in hyphal morphogenesis of *Candida albicans*.
(*Molecular Microbiology*, eingereicht)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und vor allem für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Anregungen während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Für die Übernahme des Korreferates danke ich Frau Prof. Dr. E. Knust ganz herzlich.

Den Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie sage ich Dank für die nette Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und für die unzähligen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche zwischendurch.

Vielen Dank den Mitgliedern den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Ernst für eine Zusammenarbeit, wie man sie sich besser wohl nicht wünschen kann.

Anja Sonneborn danke ich ganz besonders für die Kooperation bei unseren gemeinsamen Themen, Bernd Tebarth danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes. Ihm und Yvonne Weber gilt mein Dank außerdem für die vielen Diskussionen, Anregungen und Kritiken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die Motivation und ihrem Interesse an meiner Arbeit: Meinen Großeltern, Ruth und Wolfgang sowie Susanne und Jens. Vor allem danke ich auch meinen Eltern für ihre großartige finanzielle und ideelle Unterstützung über die gesamte Zeit. Vielen, vielen Dank besonders an Sabine, die mich über Jahre mit einer Nebenbuhlerin namens „Candida“ teilen mußte...