Untersuchungen zur Regulation und Bindespezifität des Transkriptionsfaktors Efg1 in *Candida albicans*

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Theresia Lassak
aus Königsdorf-Jastrzemb

November 2011

Aus dem Institut für Molekulare Mykologie
Department Biologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Koreferent: Prof. Dr. M. Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2011

1 Einleitung 1

1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* 1
1.2 Morphologien und Virulenzeigenschaften von *C. albicans* und deren Regulation 2
1.2.1 Hefe-Hyphe-Morphogenese 2
1.2.1.1 Regulation der Hyphenbildung 4
1.2.2 *white-opaque*-Phänotypwechsel 8
1.2.3 Chlamydosporen 10
1.3 Weitere regulatorische Funktionen des globalen Transkriptionsfaktors Efg1 10
1.3.1 Regulation des *EFG1*-Gens 11
1.4 Efg1 - ein APSES-Protein 11
1.5 Posttranslationale Modifizierung von Efg1 12
1.6 Potentielle DNA-Erkennungssequenzen von Efg1 13
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit 16

2 Material und Methoden 17

2.1 Chemikalien und Enzyme 17
2.2 Stämme und Medien 17
2.2.1 *E. coli*-Stämme 17
2.2.2 Medien und Anzucht von *E. coli* 17
2.2.3 *C. albicans*-Stämme 18
2.2.4 Medien und Anzucht von *C. albicans* 20
2.2.5 Hypheninduktion bei *C. albicans* im flüssigen Medium 21
2.3 Plasmide und Primer 21
2.3.1 Plasmide 21
2.3.2 Primer 23
2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren 25
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 25
2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen 25
2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans* 26
2.4.4 Restriktionsverdau 27
2.4.5 Ligation 27
2.4.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese 27
2.4.7 DNA-Größenstandard 27
2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 27
2.4.9 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration 28
2.4.10 Abschätzung der DNA-Konzentration im Agarosegel 28
2.4.11 DNA-Sequenzierung 28
2.4.12 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen durch Southern-Blot-Analyse 28
2.4.12.1 Sondenmarkierung 28
2.4.12.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vakuum-Blot 29

2.4.12.3 Hybridisierung und Detektion 29
2.4.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 30
2.4.13.1 Standard-PCR 30
2.4.13.2 Kolonie-PCR 30
2.4.13.3 Mutagenese-PCR 30
2.4.13.4 Real-Time-PCR 31
2.5 Transformation 33
2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (RbCl-Methode) 33
2.5.2 Transformation von *E. coli* 34
2.5.3 Transformation von *C. albicans* 34
2.6 Proteinbiochemische Methoden 34
2.6.1 Präparation von Rohextrakten aus *C. albicans* 34
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 35
2.6.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität 35
2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 35
2.6.5 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse 36
2.6.6 Gelretardierung (EMSA) 36
2.6.7 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) 37
2.6.8 ChIP-chip 39

3 Ergebnisse 42

3.1 Der Regulator Efg1 in *C. albicans* 42
3.2 Relativer Transkriptspiegel des *EFG1*-Gens während der Hypheninduktion 43
3.3 *EFG1*-Promotoraktivität in der Hefewuchsform und unter Hyphen-induktionsbedingungen 44
3.4 Deletionsanalysen zur Untersuchung der *EFG1*-Promotorregulation 46
3.4.1 Nukleotidaustausche innerhalb der EGR-Sequenzwiederholung im *EFG1*-Promotor 47
3.4.2 Deletion der dreifachen EGR-Box-Wiederholung im *EFG1*-Promotor 50
3.4.3 Deletionen innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion 51
3.4.4 Deletion einer 7 kb großen *EFG1*-Promotorregion 53
3.4.5 Einfluss der 5´-UTR auf die *EFG1*-Promotoraktivität 55
3.4.6 Untersuchungen zur *EFG1*-Promotoraktivität im *RPS10*-Lokus 57
3.4.6.1 Analyse zur 1,4 kb-*EFG1*-Promotoraktivität im *RPS10*-Lokus 57
3.4.6.2 Deletion der sieben EGR- und EGR-ähnlichen Boxen innerhalb der 3,6 kb-*EFG1*-Promotorsequenz 60
3.4.7 Die Sieben-EGR-Boxen-Region zeigt keinen Einfluss auf die *EFG1*-Promotorregulation im nativen Lokus 61
3.5 Negative Autoregulation von *EFG1* 62
3.6 Analysen zur Regulation der *SAP2*-Promotoraktivität durch Efg1 64
3.6.1 Untersuchung zur Bindung von Efg1 an den *SAP2*-Promotor 67
3.7 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) zur Untersuchung der Efg1-Bindung in *C. albicans* 69

3.7.1 Vorversuch zur Antikörper-Spezifität 69
3.7.2 ChIP-Analyse zur Bindung von Efg1 an die Stromaufwärtsregion von *EFG1* 71
3.8 Genomweite Zielsequenzen von Efg1 72
3.8.1 ChIP-chip-Analysen zur Bindung von Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen 73
3.8.1.1 Efg1-Bindung an den *EFG1*- und den *TCC1*-Promotor 73
3.8.1.2 Genomweite Zielsequenzen von Efg1 während des Hefewachstums 77
3.8.1.3 Analyse zur Efg1-Konsensus-Bindesequenz 78
3.8.2 ChIP-chip-Analysen zur Bindung von Efg1 unter Hypheninduktionsbedingungen 80
3.8.2.1 Keine Efg1-Bindung an den *EFG1*- und den *TCC1*-Promotor 30 Minuten nach Hypheninduktion 80
3.8.2.2 Bindung genomweiter Zielsequenzen durch Efg1 während der Hypheninduktion 84
3.8.2.3 Analyse zur Efg1-Konsensus-Bindesequenz während der Hypheninduktion 86
3.9 Relativer Transkriptspiegel des Gens *TCC1* während der Hypheninduktion 87

4 Diskussion 90

4.1 Efg1 bindet genomweit verschiedene chromosomale Regionen unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen 91
4.2 Die EGR-Box TATGCATA wird als Efg1-Erkennungssequenz unter Hefewachstumsbedingungen vorausgesagt 92
4.3 Die E-Box dient nicht als Bindesequenz für Efg1 94
4.4 Das MCB-Element fungiert nicht als Efg1-Erkennungssequenz 96
4.5 *EFG1*-Regulation 97
4.5.1 Die PKA-Isoform Tpk2 und der Transkriptionsfaktor Flo8 sind in die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität unter Hypheninduktions-bedingungen involviert 99
4.6 Efg1 reguliert den Repressor Tcc1 101
4.7 Regulation des *SAP2*-Gens 102
4.8 Efg1 bindet in der white-Zellform an die Promotoren von *WOR1*, *WOR2* und *CZF1* 103
4.9 Schlussfolgerungen 105

5 Zusammenfassung 107

6 Summary 108

7 Literaturverzeichnis 109

8 Abkürzungsverzeichnis 120

9 Anhang 122

1 Einleitung

1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Candida albicans zählt zur Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilzen) und ist ein fakultativ pathogener Hefepilz. Zu den Ascomyceten gehören neben den Hefepilzen auch viele Schimmelpilze (z. B. *Aspergillus fumigatus*) sowie essbare Pilze (z. B. Morchel, Trüffel). Eine große Bedeutung kommt den Schlauchpilzen bei der Lebensmittelherstellung (Bier, Wein, Brot, Käse) und in der Medizin als Produzenten von Antibiotika und Impfstoffen zu. Andererseits sind Ascomyceten aber auch für zahlreiche Krankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen verantwortlich. Etwa 80 % aller humanen Mykosen werden durch *Candida*-Arten hervorgerufen, wobei *C. albicans* zu den bedeutendsten humanpathogenen Pilzen gehört (Pfaller, 1996; Pfaller *et al.,* 1999). *C. albicans* ist ein opportunistischer Erreger, der als harmloser Kommensale bei etwa 60 % - 80 % der menschlichen Population auftritt. Der Hefepilz besiedelt dabei die Haut und/oder die Schleimhäute des Oral- und Gastrointestinaltrakts sowie des Genitalbereichs (McCullough *et al.,* 1996; Sobel, 1997; Bille *et al.,* 2005). In einer neuesten Studie von Ghannoum *et al.* (2010) zur Pilz-Flora in der Mundhöhle gesunder Menschen wurden *Candida*-Arten bei 75 % der Probanden und damit am häufigsten isoliert, gefolgt von *Cladosporium* (65 %), *Aureobasidium* (50 %), *Saccharomycetales* (50 %), *Aspergillus* (35 %), *Fusarium* (30 %) und *Cryptococcus* (20 %). Dabei war *C. albicans* auch innerhalb der *Candida*-Gattung mit 40 % die häufigste identifizierte Art. Zu den weiteren gefundenen *Candida*-Vertretern zählen *C. parapsilosis* (15 %), *C. tropicalis* (15 %), *C. khmerensis* (5 %) und *C. metapsilosis* (5 %). Ist das Immunsystem des Menschen gestört oder geschwächt, kann es neben lokal begrenzten, oberflächlichen Mykosen zu einer lebensbedrohlichen, systemischen Infektion kommen (Odds, 1988; Odds, 1994), welche in über 50 % der Fälle tödlich verläuft (Wey *et al.,* 1988). Eine systemische, invasive Candidose, bei welcher sich der Pilz über den Blutkreislauf ausbreitet und innere Organe befällt, tritt in erster Linie bei stark immunsupprimierten Menschen, beispielsweise bedingt durch eine Organtransplantation, zytostatische Chemotherapie oder HIV-Infektion, auf. Aber auch Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Adipositas und hochdosierte, längerfristige Therapien mit Antibiotika und Cortison begünstigen eine *Candida*-Infektion. Des Weiteren bildet *C. albicans* Biofilme auf Oberflächen von Kathetern und Prothesen aber auch auf Zelloberflächen von Geweben aus. Diese dreidimensionalen, komplexen - von einer Matrix umgebenen - Zusammenschlüsse von *C. albicans*-Zellen sind sehr widerstandsfähig gegen Antimykotika und von großer Bedeutung für die Pathogenität des Pilzes (Chandra *et al.,* 2001; Kumamoto und Vinces, 2005). Durch *Candida* bedingte Blutstrom-Infektionen zählen zu den vierthäufigsten Nosokomialinfektionen (Edmond *et al.,* 1999).

C. albicans ist ein diploider Organismus mit einer Genomgröße von insgesamt etwa 30 Megabasenpaaren (1n = 15 Mbp) (http://www.candidagenome.org/cache/C_albicans_SC5314_genomeSnapshot.html; Doi *et al.,* 1992). Das Genom verteilt sich dabei auf zweimal 8 Chromosomen, die mit 1 bis 7 und R benannt sind. Die beiden als R bezeichneten

Chromosomen beinhalten die kodierende Sequenz der rRNA-Gene, was sich in der Namensgebung widerspiegelt. Zwar können Paarungsprozesse stattfinden (Dignard *et al.,* 2007), jedoch konnten bisher weder haploide Stadien noch Meiose oder Sporulation bei *C. albicans* nachgewiesen werden. Als genomische Besonderheit gilt der ungewöhnliche Kodongebrauch für das Basentriplett CUG in *C. albicans*, welches in Serin statt wie üblich in Leucin translatiert wird (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995).

1.2 Morphologien und Virulenzeigenschaften von *C. albicans* und deren Regulation

C. albicans kann verschiedene morphologische Erscheinungsformen annehmen (Abb. 1.1). Der Wechsel zwischen den verschiedenen Wuchsformen erlaubt *C. albicans* eine optimale Anpassung an die vielen unterschiedlichen Nischen und Konditionen im Wirtsorganismus und steht im engen Zusammenhang mit der Pathogenität des fakultativen Erregers (Ernst, 2000).

1.2.1 Hefe-Hyphe-Morphogenese

Zum einen wächst *C. albicans* als kugelige Hefe (Blastokonidie). Die Vermehrung dieser einzelligen Wuchsform erfolgt durch Knospung und einer anschließenden Abschnürung von der Mutterzelle. Die Hefeform wird im Labor im Vollmedium bei 30 °C oder niedrigeren Temperaturen kultiviert. Zum anderen ist *C. albicans* in der Lage in einer mehrzelligen, filamentösen Form zu wachsen, wobei zwischen echten Hyphen und Pseudohyphen unterschieden wird. Beide Phänotypen weisen charakteristische Differenzen in ihrer Entstehung auf. Die Bildung von Pseudohyphen erfolgt durch unipolare Knospung, wobei die Tochterzelle mit der Mutterzelle in Kontakt bleibt statt abgeschnürt zu werden. Auf diese Weise entwickeln sich lange Zellketten aus elongierten Hefezellen mit Einschnürungen an den Septen.

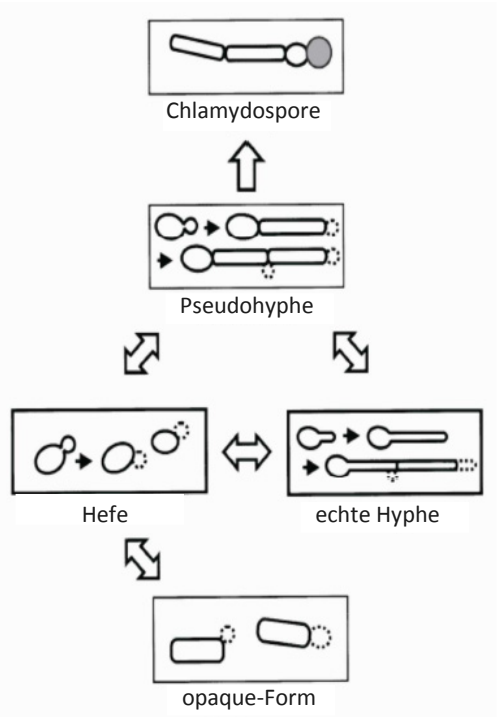


Abb.1.1: Morphologische Formen von *C. albicans* (Ernst, 2000). Die Hefeform und die Hyphenform sind die vorherrschenden Wachstumsformen bei Infektionen. Die dickwandigen Chlamydosporen entstehen an den Enden pseudohyphaler Suspensorzellen. Die Hefezellen können in eine *opaque*-Form wechseln. Gepunktete Linien deuten sich entwickelnde Tochterzellen bzw. die Regionen und die Richtung des Zellwachstums an.

Echte Hyphen entstehen durch ein kontinuierliches apikales Wachstum eines Keimschlauchs, welcher nachträglich ohne Einschnürungen septiert wird. Nach dem Einziehen von Septen können davor zudem wieder Hefezellen abknospen (Odds, 1988; Ernst, 2000; Sudbery *et al.,* 2004). Das Hyphenwachstum kann durch verschiedene Stimuli induziert werden, wobei Parallelen zu Bedingungen, wie sie im menschlichen Körper gegeben sind, bestehen. Beispielsweise führt schon eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C, welche der Körpertemperatur des Menschen entspricht, zur Bildung von Hyphen. Weiterhin können durch die Zugabe von Serum, N-Acetylglukosamin (GlcNAc) oder Prolin, durch einen neutralen pH, Sauerstofflimitierung und Hungerbedingungen („Spider"- oder „Lee´s"-Medium) Hyphen induziert bzw. verstärkt stimuliert werden (Land *et al.,* 1975; Buffo *et al.,* 1984; Cassone *et al.,* 1985; Ernst, 2000).
Die Fähigkeit von *C. albicans* zwischen der Hefe- und der Hyphenwuchsform zu wechseln, wird als Dimorphismus bezeichnet (Abb. 1.2). Dieser wird als bedeutenste Virulenzeigenschaft von *C. albicans* angesehen und ermöglicht im Verlauf einer systemischen Infektion eine optimale Anpassung an die Gegebenheiten im Wirt. Die Hefeform spielt dabei insbesondere für eine schnelle Vermehrung und Verbreitung von *C. albicans* über den Blutstrom im gesamten Körper eine entscheidende Rolle. Über die Hyphenform erfolgt hingegen eine Adhäsion an Epithelien und Endothelien und die anschließende Penetration dieser Zellen, worauf ein Vordringen in tiefere Gewebeschichten stattfindet. Die Hyphe exprimiert im Gegensatz zur Hefeform verschiedene Virulenzfaktoren, wie Adhäsine, Proteasen, Phospholipasen und Lipasen, wodurch eine invasive Infektion ermöglicht wird.

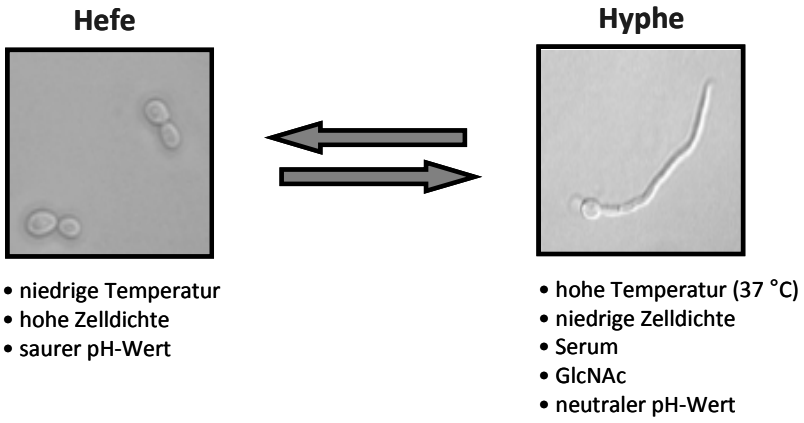


Abb. 1.2: Dimorphismus von *C. albicans*. Dargestellt ist der Wechsel zwischen der Hefeform und der Hyphenform, der durch verschiedene Wachstumsbedingungen induziert werden kann.

Für die Adhäsion an Wirtsgewebe wie auch an synthetische Oberflächen sind hyphenspezifische Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Zelloberflächen-glykoproteine zuständig, welche in erster Linie durch die *ALS* (Agglutinin-like sequences)-Genfamilie kodiert werden, die wiederum acht *ALS*-Gene umfasst (Sundstrom, 2002; Hoyer *et al.,* 2007). Einen weiteren Virulenzfaktor stellen die durch die *SAP* (secreted aspartyl proteinases)-Genfamilie kodierten Aspartylproteasen (Sap1-Sap10) dar, wobei die meisten während der Hyphenbildung sekretiert werden und u. a. eine Rolle bei der

Gewebezerstörung spielen. Ihnen kommt beispielsweise auch eine Funktion bei der Degradierung wirtsspezifischer Immunproteine zu (Naglik *et al.,* 2003).
Die Hyphenform ermöglicht es *C. albicans* dem Immunsystem des Menschen zu entkommen. Eine phagozytierte Hefezelle kann innerhalb eines Makrophagen in die Hyphenform übergehen und aus diesem wieder herauswachsen, wobei die Immunzelle dabei zerstört wird (Vasquez-Torres und Balish, 1997; Lo *et al.,* 1997; Lorenz *et al.,* 2004). Die Hyphenmorphologie ist somit von großer Bedeutung für die Pathogenität von *C. albicans*. Zellen, die keine Filamente ausbilden können, sind avirulent im Mausmodell (Lo *et al.,* 1997). Da aber ein konstitutiv filamentöser Phänotyp eine verminderte Virulenz nach sich zieht, wird dadurch auch die Wichtigkeit der Hefewuchsform für die Virulenz verdeutlicht (Gow *et al.,* 2002).

1.2.1.1 Regulation der Hyphenbildung

Die Bildung von Hyphen in *C. albicans* wird über mehrere Signaltransduktionswege gesteuert. Die beiden am besten untersuchten sind zum einen die MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Kaskade und zum anderen der parallele cAMP-abhängige PKA (Proteinkinase A)-Weg. Beide Signalwege besitzen eine große Homologie zu der MAPK-Kaskade und dem PKA-Weg in *S. cerevisiae*, über welche das Paarungsverhalten und die Pseudohyphenbildung in der nahverwandten Bäckerhefe reguliert werden (Ernst, 2000). Die Komponenten beider Signalwege in *C. albicans* wurden größtenteils durch Komplementationsanalysen in *S. cerevisiae* gefunden. Nach der Wahrnehmung eines äußeren Signals erfolgt die Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionswegs in *C. albicans* über das monomere G-Protein Ras1 (Gimeno *et al.,* 1992; Leberer *et al.,* 2001). Das Signal wird dann über die GTPase Cdc42 zur Proteinkinase Cst20 weitergeleitet. Im Anschluss werden die drei Kinasen des MAPK-Moduls, Hst1, Hst7 und Cek1, nacheinander aktiviert, worauf der Transkriptionsfaktor Cph1 induziert wird und als Folge Hyphen ausgebildet werden können (Liu *et al.,* 1994; Csank *et al.,* 1998). Im Übrigen wird über den MAPK-Weg neben der Hyphenbildung auch das Paarungsverhalten in *C. albicans* reguliert (Chen *et al.,* 2002; Magee *et al,.* 2002). Da Mutationen von Genen der MAPK-Kaskade nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu einem defekten hyphalen Wachstum führen, ist der MAPK-Signalweg nicht alleine für die Steuerung der Hypheninduktion verantwortlich. So können Mutanten des MAPK-Wegs insbesondere bei einer Serum-vermittelten Induktion trotzdem weiterhin Hyphen ausbilden (Liu *et al.,* 1994; Csank *et al.,* 1998).
Den bedeutenderen Signaltransduktionsweg für die Regulation des Dimorphismus in *C. albicans* stellt der PKA-Weg - mit dem zentralen Transkriptionsfaktor Efg1 - dar (Abb. 1.3). Deletionen in den meisten PKA-Signalweg-Komponenten führen zu einem Verlust oder einem starken Defekt der Hyphenbildung und zu einer geminderten Virulenz (Feng *et al.,* 1999; Rocha *et al.,* 2001; Miva *et al.,* 2004; Maidan *et al.,* 2005). Wie beim MAPK-Weg wird auch hier die Weiterleitung des Signals zur Hypheninduktion (z. B. eine Temperatur von 37 °C) von der Zelloberfläche über das kleine G-Protein Ras1 vermittelt, welches anschließend die Adenylatcyklase Cyr1 (Cdc35) aktiviert. Stark stimulierend auf die Adenylatcyklase wirken

auch die im Serum von Tieren aber auch vom Menschen vorkommenden Muramyldipeptide (MDP), wobei es sich um strukturelle Einheiten des bakteriellen Peptidoglycans (Murein) der Zellwand handelt. In einer Studie von Xu *et al.* (2008) wurde nachgewiesen, dass diese die LRR-Domäne, eine Leucin-reiche Wiederholungssequenz, der Adenylatcyklase binden und diese dadurch aktiviert wird. Der PKA-Weg wird zudem auch durch eine hohe CO_2-Konzentration, wie diese z.B. mit 5 - 6 % im Blut vorliegt, angeschaltet. Unter physiologischen Bedingungen reagiert CO_2 mit H_2O spontan zu HCO_3^- und H^+, wobei das Hydrogencarbonat die Cyr1-Adenylatcyklase - unabhängig von Ras1 - aktiviert (Klengel *et al*., 2005; Bahn und Mühlschlegel, 2006). Dies führt zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration des „second messengers" cAMP. Daneben erfolgt die Regulation des cAMP-Spiegels zusätzlich durch die Phosphodiesterase Pde2, welche für eine Hydrolyse von cAMP verantwortlich ist (Rocha *et al.,* 2001; Jung und Stateva, 2003). Durch die Bindung von cAMP an die PKA kommt es aufgrund einer Konformationsänderung zur Freisetzung der inhibierenden regulatorischen Untereinheit Bcy1 (zwei Bcy1-Proteine). Als Folge werden die beiden katalytischen Isoformen der Proteinkinase A, Tpk1 und Tpk2, aktiviert (Bockmühl *et al.,* 2001; Sonneborn *et al.,* 2000). Im Vergleich zu *C. albicans* existieren in *S. cerevisiae* hingegen drei Isoformen der PKA, Tpk1, Tpk2 und Tpk3 (Robertson und Fink, 1998). Die beiden Isoformen in *C. albicans* zeigen eine unterschiedliche regulatorische Funktion in der Filamentbildung auf. Während Tpk1 beim hyphalen Wachstum auf festem Medium eine positive Rolle spielt, reguliert Tpk2 die Hyphenbildung eher im flüssigen Medium (Bockmühl *et al.,* 2001; Cassola *et al.,* 2004).

Durch die PKA wird der Transkriptionsfaktor Efg1 (Enhanced Filamentous Growth) aktiviert, welcher eine Schlüsselposition bei der Regulation der Morphogenese in *C. albicans* einnimmt (Stoldt *et al.,* 1997; Bockmühl und Ernst, 2001). Es gibt Hinweise, dass Efg1 durch die PKA phosphoryliert wird. So wurde festgestellt, dass Efg1 nach dem Austausch einer potentiellen PKA-Phosphorylierungsstelle den *efg1*-Deletionsphänotyp nicht mehr komplementieren kann (Bockmühl und Ernst, 2001). In *S. cerevisiae* induziert die PKA die Transkriptionsfaktoren Phd1 und Sok2, welche die Pseudohyphenbildung regulieren (Ward *et al.,* 1995; Stoldt *et al.,* 1997). Die Disruption von *EFG1* in *C. albicans* äußert sich unter nahezu allen hypheninduzierenden Bedingungen in einem vollständigen Verlust des filamentösen Wachstums (Lo *et al.,* 1997; Ernst, 2000), weshalb Efg1 als einer der wichtigsten Regulatoren der Hyphenbildung gilt.

Der Transkriptionsfaktor Flo8 wirkt ebenfalls im PKA-Signalweg mit und steuert vermutlich zusammen mit Efg1 die Ausbildung von Hyphen (Abb. 1.3). Die *flo8*-Mutante ist nicht mehr in der Lage Hyphen auszubilden und zeigt wie die *efg1*-Mutante eine stark abgeschwächte Virulenz im Mausmodell. Durch genomweite Transkriptomanalysen wurde gezeigt, dass Flo8 gleiche Gengruppen wie Efg1 reguliert, wobei vor allem hyphenspezifische Gene und wichtige Gene für die Virulenz betroffen sind. Außerdem konnte eine Interaktion zwischen Efg1 und Flo8 *in vivo* nachgewiesen werden (Cao *et al.,* 2006; Noffz *et al.,* 2008). In Abhängigkeit von Efg1 werden weitere Regulatoren der Hyphen-Morphogenese aktiviert, was zur Inhibierung hefespezifischer Gene und zur Induktion hyphenspezifischer Gene führt. Der zur TEA/ATTS-Familie gehörende Transkriptionsfaktor Tec1 wird in erster Linie in der Hyphenwuchsform exprimiert. Die *tec1*-Mutante weist einen starken Defekt in der

Hyphenausbildung bei Serum-Induktion auf und ist nicht mehr in der Lage nach Phagozytose durch Makrophagen aus diesen wieder herauszuwachsen (Schweizer *et al.,* 2000). Transkriptomstudien belegen, dass die Expression von *TEC1* nicht nur durch Efg1 sondern auch durch den Transkriptionsfaktor Cph2 reguliert wird (Lane *et al.,* 2001).

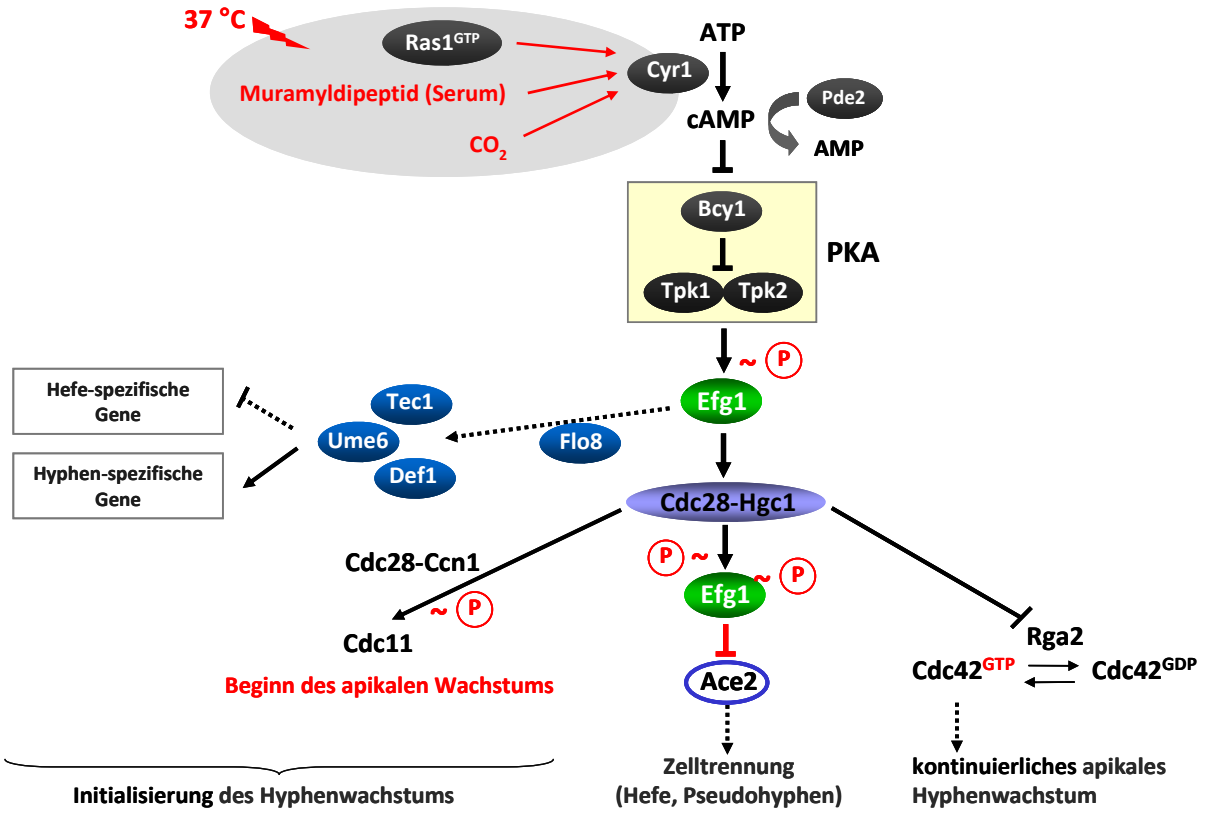


Abb. 1.3: Regulation der Hyphenbildung in *C. albicans* über den cAMP-abhängigen PKA (Proteinkinase A)-Signaltransduktionsweg. Durch einen äußeren Stimulus (z. B. Temperatur, Muramyldipeptide, CO_2) wird die Adenylatcyklase Cyr1 - teilweise über das monomere G-Protein Ras1 - aktiviert. Als Folge steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel an, wodurch die katalytischen Untereinheiten der PKA, Tpk1 und Tpk2, aktiviert werden. Die PKA-Isoformen aktivieren wiederum den Transkriptionsfaktor Efg1, der als zentraler Regulator der Morphogenese in *C. albicans* gilt (grün dargestellt). Efg1 induziert weitere Transkriptionsfaktoren (blau dargestellt), welche zur Bildung von Hyphen beitragen. Zugleich aktiviert Efg1 den Cdc28-Hgc1-Komplex. Indem dieser die Phosphorylierung des Septin-Proteins Cdc11 durch Cdc28-Ccn1 aufrechterhält, wird das polare Hyphenwachstum initialisiert und sicher gestellt. Zudem inhibiert Cdc28-Hgc1 das GAP Rga2, so dass die Rho-GTPase Cdc42 verstärkt in der GTP-Form in der Hyphenspitze vorliegt und so ein kontinuierliches apikales Hyphenwachstum gewährleistet wird. Des Weiteren wird Efg1 durch Cdc28-Hgc1 phosphoryliert. Als Folge inhibiert Efg1 Zielgene des Transkriptionsfaktors Ace2, wodurch die Zelltrennung während des Hyphenwachstums unterbunden wird. Pfeile verdeutlichen eine Induktion, während eine Inhibierung durch einen " Balkenstrich" dargestellt ist.

Des Weiteren üben die Transkriptionsfaktoren Ume6 und Def1 (Eed1) einen positiven Effekt auf die Filamentbildung aus. Eine *UME6*- oder *DEF1*-Deletion hat ein verkürztes

Hyphenwachstum und eine verminderte Virulenz zur Folge. Zudem gehen die Zellen nach einigen Stunden trotz Hypheninduktionsbedingungen wieder in die Hefeform über. Es wurde gezeigt, dass *UME6* und *DEF1* (*EED1*) Efg1-abhängig während der Hypheninduktion aktiviert werden und für die Aufrechterhaltung des hyphalen Längenwachstums zuständig sind, wobei sie den Hyphe-zu-Hefe-Übergang reprimieren (Banerjee *et al.,* 2008; Zeidler *et al.,* 2009; Zakikhany *et al.,* 2007; Martin *et al.,* 2011).

Efg1 induziert zudem die Expression des G1-Cyklin-verwandten Proteins Hgc1, welches essentiell für die Hyphenmorphogenese ist. Eine *HGC1*-Deletion beeinträchtigt die Zellpolarisierung und führt zu einem starken Defekt in der Ausbildung hyphaler Zellketten (Zheng *et al.,* 2004). *HGC1* wird spezifisch während des Hyphenwachstums exprimiert, wobei das Transkript in der apikalen Hyphenzelle nachweisbar ist (Wang *et al.,* 2007). In Assoziation mit der Cyklin-abhängigen Kinase Cdc28 reguliert Hgc1 das Septin Cdc11 (Abb. 1.3) - ein Cytoskelettfilament-bildendes Protein - welches eine Rolle für das polare Zellwachstum spielt. Als Antwort auf die Hypheninduktion wird Cdc11 unabhängig vom PKA-Weg durch den Komplex aus Cdc28 und dem Cyklin Ccn1 phosphoryliert, wobei Cdc28-Hgc1 für die anschließende Aufrechterhaltung dieser Phosphorylierung am Ser395 während des Hyphenwachstums benötigt wird. Bei Abwesenheit von Hgc1 geht dieser Phosphorylierungszustand schnell verloren, was zu einer Beeinträchtigung der Hyphenentwicklung und der Virulenz führt (Sinha *et al.,* 2007; Wang, 2009). Des Weiteren inhibiert Cdc28-Hgc1 das GAP (GTPase-aktivierendes Protein) Rga2 durch Phosphorylierung, worauf sich die GTPase Cdc42 in der aktiven GTP-gebundenen Form in der Hyphenspitze anhäufen kann und als Folge ein kontinuierliches apikales Hyphenwachstum ermöglicht wird (Zheng *et al.,* 2007; Court und Sudbery, 2007). Viele der durch den Transkriptionsfaktor Ace2 regulierten Gene, wie beispielsweise *CHT3* (Chitinase), kodieren für Enzyme, die in die Zelltrennung beim Hefe- bzw. Pseudohyphenwachstum involviert sind. Cdc28-Hgc1 phosphoryliert Efg1 an Position T179, worauf Efg1 Ace2-aktivierte Gene durch Bindung an deren Promotoren supprimiert, so dass die Zelltrennung während des echten Hyphenwachstums blockiert wird (Wang *et al.,* 2009).

Zu den Haupt-Regulatoren, die eine Repressor-Funktion auf die Hyphenbildung ausüben, gehören insbesondere die Transkriptionsfaktoren Tup1, Nrg1 und Rfg1, welche unter hyphalen Wachstumsbedingungen inhibiert sind (Kadosh und Johnson, 2001; Kadosh und Johnson, 2005). Studien von Braun *et al.* (2001) und Murad *et al.* (2001) belegen eine Herabregulation des *NRG1*-Transkripts als Antwort auf Hypheninduktionsbedingungen. Mutanten, die eine Disruption in einem der drei Gene (*TUP1, NRG1, RFG1*) tragen, weisen einen filamentösen bzw. hyperfilamentösen (Δ*nrg1*, Δ*tup1*) Phänotyp in Abwesenheit Hyphen-induzierender Stimuli auf und sind deutlich weniger virulent im Mausmodell (Braun und Johnson, 1997; Braun *et al.,* 2001; Murad *et al.,* 2001; Kadosh und Johnson, 2001; Khalaf und Zitomer, 2001). Es wurde gezeigt, dass der hyperfilamentöse *tup1*-Phänotyp durch eine zusätzliche *EFG1*-Deletion aufgehoben wird. Die Repression der Hyphenbildung erfolgt durch eine Rekrutierung von Tup1 an Promotoren hyphenspezifischer Gene, welche durch die DNA-bindenden Proteine Nrg1 und Rfg1 vermittelt wird. Beispielsweise inhibiert der Nrg1-Tup1-Komplex die Expression von *DEF1* und *UME6* unter Hefewachstumsbedingungen (Martin *et al.,* 2011). Einen weiteren Repressor der Hyphenbildung stellt der

Transkriptionsfaktor Tcc1 dar (Kaneko *et al.*, 2006). *tcc1*-Mutanten weisen ein filamentöses Wachstum unter Hefekonditionen und eine verminderte Virulenz auf. Zudem wurde gezeigt, dass Tcc1 mit Tup1 interagieren kann, was auf eine Tup1-Tcc1-vermittelte Reprimierung des hyphalen Wachstums deutet (Kaneko *et al.*, 2006).

1.2.2 *white-opaque*-Phänotypwechsel

C. albicans kann zwischen den beiden verschiedenen Zelltypen *white* und *opaque* wechseln (Abb. 1.1), wobei der Phänotyp dann über viele Generationen erhalten bleibt; ein Morphologiewechsel erfolgt spontan und lediglich etwa alle 10^3 bis 10^4 Zellteilungen (Slutsky *et al.,* 1987; Rikkerink *et al.,* 1988). Jedoch kann die Switching-Rate durch äußere Bedingungen, wie z.B. die Temperatur, beeinflusst werden. Der *white*-Phänotyp bildet glatte, weiße Kolonien und zeigt die normale, rundliche Hefezellform auf, während sich der *opaque*-Phänotyp durch einen abgeflachten, gräulichen Koloniewuchs auszeichnet und eine stäbchenförmige Zellform mit kleinen Auswüchsen („Pimples“) auf der Zelloberfläche besitzt. Die beiden Zelltypen unterscheiden sich zudem in ihren Genexpressionsmustern, ihrer Fähigkeit Hyphen zu bilden und in ihrer Paarungskompetenz. Im Infektionsprozess sind die *white*-Zellen (Hefeform) für eine Verbreitung im Blutkreislauf zuständig, wobei der *opaque*-Zellform eher eine Rolle bei der Besiedlung von Zelloberflächen als auch bei der Paarung von *C. albicans* zukommt (Kvaal, C.A. *et al.,* 1997; Kvaal, C.A. *et al.,* 1999; Lachke *et al.,* 2003).

Das *white-opaque*-Switching ist eng mit dem Paarungstyp-Lokus *MTL* (mating type-like) verknüpft (Miller und Johnson, 2002). Die meisten *C. albicans*-Isolate (> 95 %) enthalten zwei verschiedene *MTL*-Allele, *MTL*a und *MTL*α (a/α Zellen), und können daher den Repressor a1-α2 synthetisieren, welcher den Wechsel vom *white*- in den *opaque*-Zustand durch Repression des Regulatorgens *WOR1* inhibiert (Abb. 1.4). *MTL*-heterozygote Zellen verbleiben daher die ganze Zeit in der *white*-Phase (Miller und Johnson, 2002). *C. albicans*-Zellen können für den *MTL*a- (a-Zellen) oder den *MTL*α-Lokus (α-Zellen) - durch mitotische Rekombination oder den Verlust eines *MTL*-enthaltenden Chromosoms mit anschließender Duplikation des anderen homologen Chromosoms - homozygot werden. *MTL*-homozygote a- und α-Zellen produzieren den a1-α2-Repressor nicht mehr und können folglich von der *white*-Phase in die paarungskompetente *opaque*-Form wechseln (Lockhart *et al.,* 2002; Lockhart *et al.,* 2003).

Da *C. albicans* diploid ist, entsteht nach dem Paaren einer *opaque* a-Zelle mit einer *opaque* α-Zelle eine tetraploide a/α-Zelle, welche wieder den *white*-Phänotyp annimmt. Der diploide Zustand kann durch einen Chromosomenverlust erlangt werden. Eine konventionelle Meiose ist wie schon zu Beginn erwähnt bei *C. albicans* nicht bekannt. Obwohl *MTL*-homozygote a- und α-Zellen zwischen den beiden Zuständen *white* und *opaque* wechseln können, scheint die *white*-Form die stabilere bzw. häufiger vorkommende der beiden zu sein. Denn *opaque*-Zellen können zwar über viele Generationen bei 24 °C stabil bleiben, aber sobald die Temperaturen die 30 °C-Grenze überschreiten, gehen sie massiv in die *white*-Form über (Slutsky *et al.,* 1987; Rikkerink *et al.,* 1988). Es sind keine äußeren Bedingungen bekannt, die

die *white*-Form im vergleichbaren Ausmaß destabilisieren. Oxidativer Stress erhöht jedoch die Switching-Frequenz von der *white*- in die *opaque*-Form (Kolotila *et al.,* 1990). Allerdings wurde beobachtet, dass der *opaque*-Phänotyp unter hypoxischen Bedingungen trotz einer hohen Temperatur von 37 °C etwa eine Woche stabil bleibt statt direkt in die *white*-Form zu wechseln, so dass eine Paarung im menschlichen Körper unter diesen Bedingungen möglich ist (Dumitru *et al.,* 2007).

Der Transkriptionsfaktor Efg1 spielt beim Wechsel von der *opaque*-Form in die *white*-Form und für deren Aufrechterhaltung eine bedeutende Rolle (Sonneborn *et al.,* 1999b). Für *EFG1* konnten zwei unterschiedlich große Transkripte nachgewiesen werden, nämlich ein 3,2 kb-großes Haupttranskript und ein etwa 20-fach geringer exprimiertes, kleineres Nebentranskript von 2,2 kb (Tebarth *et al.,* 2003). In *white*-Zellen liegt ausschließlich das

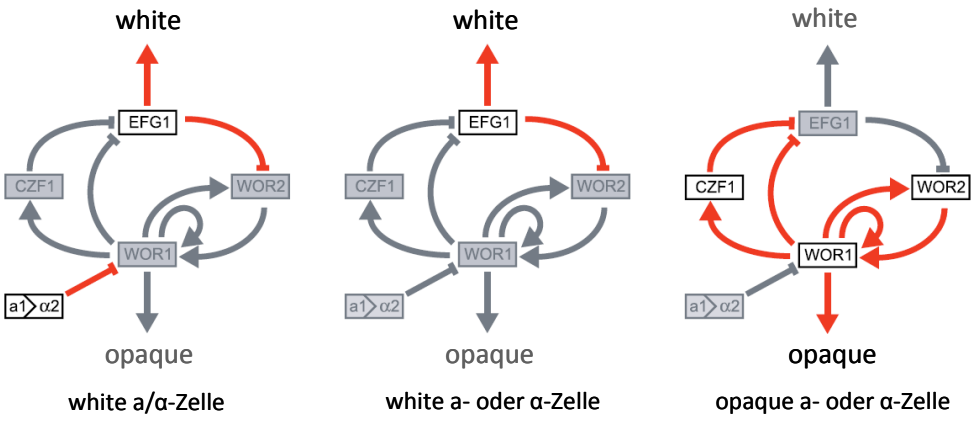


Abb. 1.4: Regulationsschema zum *white-opaque*-Phänotypwechsel in *C. albicans*. Gene in weißen Kästen sind heraufreguliert, Gene in grauen Kästen sind herabreguliert. Rote aktivierende Pfeile und rote reprimierende Balken repräsentieren einen aktiven regulatorischen Zustand; Pfeile/Balkenlinien in grau zeigen eine inaktive regulatorische Beziehung, wobei die vier Gene *EFG1, WOR1, WOR2* und *CZF1* für Transkriptionsfaktoren kodieren. Der a1-α2-Repressor (*MAT*a- und *MAT*α-kodiert) wird nur in heterozygoten a/α-Zellen produziert. Die Abbildung stammt aus der Publikation von Zordan *et al.* (2007).

große *EFG1*-Transkript vor, in Zellen der *opaque*-Form wird *EFG1* hingegen gar nicht bzw. kaum transkribiert (Sonneborn *et al.,* 1999b; Srikantha *et al.,* 2000). Eine Überexpression von *EFG1* in *opaque*-Zellen bewirkt einen Übergang in den *white*-Zustand und verdeutlicht den positiven Einfluss von Efg1 auf die *white*-Zellform (Sonneborn *et al.,* 1999b). Als positive Regulatoren der *opaque*-Form und damit als Gegenspieler von Efg1 agieren die Transkriptionsfaktoren Wor1, Wor2 und Czf1 (Zordan *et al.,* 2007; Abb. 1.4), welche einen erhöhten Transkriptspiegel in Zellen der *opaque*-Form in Relation zu *white*-Zellen aufweisen (Lan *et al.,* 2002, Tsong *et al.,* 2003).

1.2.3 Chlamydosporen

Als weitere morphologische Erscheinungsform kann *C. albicans* Chlamydosporen bilden (Abb. 1.1). Hierbei handelt es sich um runde, dickwandige Zellen, welche an den Enden elongierter Suspensorzellen von Pseudohyphen entstehen und etwa dreimal so groß wie Hefezellen sind (Joshi *et al.,* 1993). Chlamydosporen können durch Nährstoffarmut, Sauerstofflimitierung, eine niedrige Zelldichte und bei niedrigen Temperaturen (25°C) induziert werden. Unter Laborbedingungen lässt sich die Bildung dieser Zellform auf Maismehl-Agarplatten unter sauerstoffarmen Bedingungen stimulieren. Glukose führt hingegen zu einer Unterdrückung dieser Wuchsform (Dujardin *et al.,* 1980a, 1980b). Für die Entwicklung von Chlamydosporen ist der Transkriptionsfaktor Efg1 essentiell, da die *efg1*-Mutante nicht in der Lage ist diese zu bilden (Sonneborn *et al.,* 1999b). Die genaue biologische Funktion der Chlamydosporen ist zwar noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird angenommen, dass es sich um eine Überdauerungsform von *C. albicans* handelt (Joshi *et al.,* 1993). Die Fähigkeit zur Bildung von Chlamydosporen wird als Unterscheidungsmerkmal zu anderen Hefen und nahezu allen anderen *Candida*-Spezies in der Diagnostik herangezogen.

1.3 Weitere regulatorische Funktionen des globalen Transkriptionsfaktors Efg1

Während Efg1 unter Normoxie als Aktivator der Filamentbildung agiert, gilt er unter hypoxischen Wachstumsbedingungen als Repressor des Hyphenwachstums. So zeigt die *efg1*-Mutante unter sauerstoffarmen Bedingungen beim Wachstum auf festem Medium und einer Temperatur von 25 °C bis 35 °C sogar eine Hyperfilamentierung (Sonneborn *et al.,* 1999a; Brown *et al.,* 1999; Setiadi *et al.,* 2006; Stichternoth, 2009; Ernst und Tielker, 2009). Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Czf1 gilt als Gegenspieler von Efg1 und ist notwendig für eine Hyphenbildung während des Wachstums unter Einbettung in eine Agar-Matrix, was mit sauerstofflimitierten Bedingungen korreliert (Brown *et al.,* 1999; Guisani *et al.,* 2002). Dabei unterdrückt Czf1 die reprimierende Funktion von Efg1 unter Hypoxie. Bei Agar-Einbettung führt die Überexpression von *CZF1* zu einer Verstärkung und eine Deletion von *CZF1* zu einer Reduzierung der Hyphenbildung (Brown *et al.,* 1999; Giusani *et al.,* 2002). Bisherige Untersuchungen belegen eine Interaktion zwischen dem bHLH-Transkriptionsfaktor Efg1 und dem Zinkfinger-Protein Czf1 (Giusani *et al.,* 2002; Noffz *et al.,* 2008). Zudem wurde mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) gezeigt, dass beide Transkriptionsfaktoren, Efg1 und Czf1, an den *CZF1*-Promotor binden und die *CZF1*-Transkription regulieren. Eine Deletion von *EFG1* verhindert die *CZF1*-Expression (Vinces *et al.,* 2006).
Des Weiteren ergaben genomweite Transkriptomanalysen, dass Efg1 glykolytische Gene aktiviert und Gene des oxidativen Stoffwechsels reprimiert (Doedt *et al.,* 2004). Damit kommt Efg1 auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Metabolismus in *C. albicans* zu, wobei auch hier wieder seine Funktion als Aktivator und als Repressor zum Tragen kommt.
Weiterhin reguliert Efg1 wichtige Virulenzfaktoren. So konnte beispielsweise eine Efg1-abhängige Expression der für saure Aspartylproteasen kodierenden Gene *SAP4*, *SAP5* und

SAP6 während der Hypheninduktion festgestellt werden (Schröppel *et al.,* 2000). Auch die für Adhäsine kodierenden Gene *ALS1*, *ALS3* und *HWP1,* deren Expression hyphenspezifisch ist, werden durch Efg1 induziert (Hoyer *et al.,* 1998; Sharkey *et al.,* 1999; Fu *et al.,* 2002).
Efg1 ist zudem für die Biofilmbildung, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen, von großer Bedeutung (Ramage *et al*., 2002; Stichternoth und Ernst, 2009). Die *efg1*-Mutante zeigt einen sehr starken Defekt im Biofilmaufbau. Statt der dreidimensionalen komplexen Architektur aus Hefe- und Hyphenzellen, welche von einer äußeren Matrix umschlossen ist, bildet die *efg1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine spärliche, einschichtige Struktur aus einem lockeren Zusammenschluss von Hefe-ähnlichen Zellen (Ramage *et al*., 2002).

1.3.1 Regulation des *EFG1*-Gens

Wie in Abschnitt 1.2.1.1 beschrieben, agiert Efg1 als wichtiger Regulator des Dimorphismus. Es wird angenommen, dass *EFG1* einer negativen Autoregulation unterliegt (Tebarth *et al.,* 2003). Mit Hilfe eines *EFG1*-Überexpressionskonstrukts und einer *EFG1*-Promotor-*LAC4*-Reporterfusion wurden die ersten Hinweise auf eine Efg1-abhängige Reprimierung der *EFG1*-Promotoraktivität in *C. albicans* erhalten (Tebarth *et al.,* 2003). Zudem war dies der erste Hinweis dafür, dass Efg1 an seinen eigenen Promotor bindet. Des Weiteren war in einer Northern-Analyse ein starker Abfall des *EFG1*-Haupttranskripts zu Beginn der Hypheninduktion feststellbar. Beim Ausbleiben dieser Herabregulation des *EFG1*-Transkripts bilden die Zellen Pseudohyphen statt echter Hyphen (Tebarth *et al.,* 2003). Auch bei einer Überexpression von *EFG1* in *C. albicans* ist eine Pseudohyphenbildung zu beobachten, wohingegen die Bildung echter Hyphen ausbleibt (Stoldt *et al.,* 1997; Tebarth *et al.,* 2003). Mittels einer Chromatinimmunpräzipitations (ChIP)-Analyse konnte eine Interaktion zwischen Efg1 und dem *EFG1*-Promotor nahe dem Haupt-Transkriptionsstartpunkt nachgewiesen werden (Tebarth *et al.,* 2003; Doedt, 2003). Es wird vermutet, dass die negative *EFG1*-Regulation durch eine Interaktion von Efg1 mit dem Rpd3/Sin3-Histondeacetylase-Komplex vermittelt wird. Zum einen konnte durch Zwei-Hybrid-Analysen eine Interaktion zwischen Efg1 und Sin3 gezeigt werden und zum anderen wurde ebenfalls wie für Efg1 eine Bindung von Sin3 an den *EFG1*-Promotor durch ChIP-Untersuchungen bestätigt (Tebarth *et al.,* 2003; Doedt, 2003). So weist die *sin3*-Mutante mit dem Ausbleiben des *EFG1*-Transkriptabfalls einen Verlust der negativen Autoregulation auf und wächst pseudohyphal unter Hypheninduktionsbedingungen.

1.4 Efg1 - ein APSES-Protein

Der Transkriptionsfaktor Efg1 gehört zur sogenannten APSES-Proteinfamilie. Dies ist eine kleine Gruppe von Transkriptionsfaktoren in Pilzen, die alle in die Regulation morphogenetischer Prozesse involviert sind. Den APSES-Proteinen ist eine ca. 100 Aminosäuren große APSES-Domäne gemeinsam, welche ein zentral gelegenes bHLH-Motiv

aufweist und innerhalb der Mitglieder dieser Familie hoch konserviert ist. Die APSES-Namensgebung basiert auf den Anfangsbuchstaben der zuerst in Ascomyceten identifizierten Proteine dieser Familie (**APSES** = **A**sm1, **P**hd1, **S**ok1, **E**fg1, **S**tuA). So reguliert Asm1 aus *Neurospora crassa* die Ascosporenreifung (Aramayo *et al*., 1996). In *S. cerevisiae* induziert Phd1 das Pseudohyphenwachstum, wohingegen Sok2 durch eine Reprimierung der Pseudohyphenbildung entgegengesetzt wirkt (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al*., 1995). StuA aus *Aspergillus nidulans* reguliert die Konidiosporenreifung (Dutton *et al*., 1997). Der Transkriptionsfaktor PmStuA aus *Penicillium marneffei*, welcher ebenfalls für die Bildung von Konidiosporen zuständig ist, wurde später als weiteres Mitglied der APSES-Familie hinzugefügt (Borneman *et al.,* 2002). Darüber hinaus wurde kürzlich in dem parasitischen Brandpilz *Ustilago maydis* (Maisbeulenbrand)*,* welcher zu den Basidiomyceten zählt, das APSES-Protein Ust1 gefunden, welches beim Hefe-Hyphe-Übergang, dem Paarungsprozess und der Basidiosporen-Entwicklung eine Rolle spielt (García-Pedrajas *et al.,* 2010).
In *C. albicans* wurde außer Efg1 noch ein zweites APSES-Protein identifiziert, welches aufgrund seiner 28 %igen Homologie zu Efg1 als Efh1 (Efg1 Homolog) bezeichnet wurde. Auf DNA-Ebene weist der *EFH1*-ORF eine Identität von 45 % zum *EFG1*-ORF auf. Das 525 Aminosäuren große Efg1-Protein besitzt eine Glutamin-reiche Region sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich (19 % Glutaminreste). Efh1 ist mit 720 Aminosäuren größer und weist ebenfalls Glutamin-reiche Bereiche auf (15 %); im Vergleich zu Efg1 befinden sich zwei Q-Streche lediglich im N-terminalen Efh1-Protein. Ansonsten existiert bis auf die APSES-Domäne nur wenig Sequenz-Ähnlichkeit zwischen Efg1 und Efh1. Die *efh1*-Mutante weist keinen morphologischen Unterschied zum Wildtyp auf. Eine *efh1*/*efg1*-Doppelmutante jedoch zeichnet sich unter eingebetteten Bedingungen durch eine noch stärkere Hyperfilamentierung aus als die *efg1*-Einfachmutante (Stempel, 2003; Doedt *et al.,* 2004). Es wird angenommen, dass Efh1 eine verstärkende Wirkung auf die Efg1-vermittelte Hyphen-Repression unter sauerstoffarmen Bedingungen besitzt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Promotoraktivität von *EFH1* etwa 10-fach schwächer ist als die von *EFG1,* was sich im Vergleich zur *EFG1*-Expression in einem deutlich niedrigeren *EFH1*-Transkriptlevel widerspiegelt (Doedt *et al.,* 2004).

1.5 Posttranslationale Modifizierung von Efg1

Die theoretische molekulare Größe von Efg1 beträgt ca. 61 kDa. In Immunoblot-Analysen ist Efg1 jedoch deutlich oberhalb der erwarteten Laufhöhe bei etwa 83 kDa zu detektieren. Genauer genommen tritt in *S. cerevisiae* oder in *C. albicans* exprimiertes Efg1 bei einer entsprechenden Auftrennung als Dreifachbande auf (ca. 75 kDa, ca. 83 kDa und ca. 88 kDa). Dabei besitzt die mittlere 83 kDa Efg1-Bande die höchste Intensität (Sonneborn, 1999; Kurtz, 2010). In *E. coli* exprimiertes Efg1 ist als Einzelbande ebenfalls bei etwa 75 kDa nachzuweisen (Kurtz, 2010). Weshalb Efg1 in Relation zu seiner errechneten Molekularmasse deutlich höher läuft ist bis heute nicht verstanden. Es ist bekannt, dass Efg1 posttranslational phosphoryliert wird, da nach einer Behandlung von *C. albicans*-Rohextrakten mit alkalischer Phosphatase nur noch die unterste der drei Efg1-Banden in verstärkter Intensität detektiert

werden kann (Bockmühl, 2001; Kurtz, 2010). Efg1 ist eine zentrale Komponente im PKA-Signaltransduktionsweg und essentiell für das hyphale Wachstum unter normoxischen Bedingungen. Es wird angenommen, dass Efg1 durch eine Phosphorylierung durch die PKA-Isoformen Tpk1/Tpk2 aktiviert wird und als Folge seine eigene Transkription als Voraussetzung für die Ausbildung echter Hyphen herabreguliert und zeitgleich hyphenspezifische Gene induziert. Efg1 besitzt innerhalb der APSES-Domäne eine Proteinkinase A-Konsensussequenz R-V-T (Arginin-Valin-Threonin) mit einer potentiellen Phosphorylierungsstelle an der Position T206 (Kennelly und Krebs*.,* 1991; Bockmühl und Ernst, 2001). Ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle gegen ein Alanin führt zu einem Defekt in der Hyphenbildung von *C. albicans* (Bockmühl und Ernst, 2001). Wird diese Position also nicht phosphoryliert, wachsen die Zellen auf festem und in flüssigem Spider-Medium afilamentös. Unter anderen Hypheninduktionsbedingungen, z.B. bei N-Acetylglucosamin- oder Serum-Induktion, bilden diese Zellen vermindert echte Hyphen aus (Bockmühl und Ernst, 2001). Bei einer Substitution des Threonins an Position 206 gegen ein Glutamat wird durch die negative Ladung der Carboxylgruppe eine konstante Phosphorylierung imitiert. Dieser Aminosäureaustausch äußert sich in einem hyperfilamentösen Wachstum von *C. albicans* und vermag sogar auch den Hyphendefekt von *tpk*-Deletionsstämmen zu komplementieren (Bockmühl und Ernst, 2001; Bockmühl, 2001). Bei der Hyphen-Regulation durch Efg1 spielt somit die Phosphorylierung an der Stelle T206 durch die PKA eine bedeutende Rolle.
Weitere Aminosäure-Substitutions-Analysen bestätigen, dass neben der Proteinkinase A noch andere Kinasen in die Regulation des bHLH-Transkriptionsfaktors Efg1 involviert sein müssen. So führten bestimmte Aminosäureaustausche (L241R, T248A/E bzw. R262L) zu einer Inhibierung der Hyphen-, Pseudohyphen- oder Chlamydosporenbildung (Bockmühl, 2001). Zudem ist bekannt, dass Efg1 durch die Cyklin-abhängige Kinase Cdc28 im Komplex mit dem hyphenspezifischen G1-Cyklin Hgc1 an der Position T179 während der Hypheninduktion phosphoryliert wird (Abschnitt 1.2.1.1; Abb 1.3). Diese Daten verdeutlichen, dass Efg1 an mehreren Stellen phosphoryliert wird.

1.6 Potentielle DNA-Erkennungssequenzen von Efg1

Die APSES-Domäne von ca. 100 Aminosäuren enthält ein zentral gelegenes, basisches Helix-Loop-Helix (bHLH)-Motiv, weshalb Efg1 und die übrigen APSES-Mitglieder zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren gezählt werden. Das hoch konservierte bHLH-Motiv umfasst ca. 50 bis 60 Aminosäuren und besitzt einen kurzen C-terminalen Abschnitt mit vorwiegend basischen Aminosäuren gefolgt von zwei α-Helices, welche über einen variablen Loop miteinander verbunden sind. Der basische etwa 10 bis 15 Aminosäuren umfassende Teil vermittelt dabei die Bindung an die DNA, während die Helices-Region als Dimerisierungsdomäne fungiert und eine Proteininteraktion mit anderen bHLH-Faktoren ermöglicht (Ma *et al.,* 1994; Dutton *et al.,* 1997; Stoldt *et al.,* 1997). Die bHLH-Proteine sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert und zählen mehr als 240 Mitglieder (Atchley und Fitch, 1997; Massari und Murre, 2000; Ledent und Vervoort, 2001). Zu den ersten

identifizierten und gut untersuchten bHLH-Transkriptionsfaktoren gehören MyoD, Myc und Max in Säugern (Ferre-d´ Amare *et al.,* 1993; Ellenberger *et al.,* 1994). MyoD reguliert dabei die Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen während der Embryogenese. Myc und Max steuern den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Apoptose und Differenzierungsprozesse. bHLH-Proteine binden als Homo- oder Heterodimere an die DNA und können aufgrund der vielen möglichen Dimerkombinationen unterschiedliche Gene bzw. Prozesse regulieren. So ist beispielsweise bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Max mit sich selbst Homodimere ausbilden kann, aber auch mit den bHLH-Proteinen Myc, Mad oder Mxi1 als Heterodimer agiert. Es wurde gezeigt, dass Mad-Max-Komplexe während der Zelldifferenzierung vorherrschen, während Myc-Max-Komplexe während der Zellproliferation von Bedeutung sind (Hurlin *et al.,* 1994).

Für bHLH-Proteine wurde ermittelt, dass diese an sogenannte E-Boxen mit der Konsensussequenz CANNTG im Promotorbereich ihrer Zielgene binden (Massari und Murre, 2000; Robinson und Lopes, 2000). Aufgrund der großen Homologie zwischen der bHLH-Domäne von Efg1 und den bHLH-Motiven von Myc, Max und MyoD und der für die DNA-Bindung wichtigen gemeinsamen konservierten Aminosäuren, wurde vermutet, dass Efg1 ebenfalls die E-Box-Sequenz zur DNA-Bindung nutzen könnte (Stoldt *et al.,* 1997). So konnte eine *in vitro* Bindung von Efg1 an ein Promotorfragment von *ALS3,* welches die E-Box-Sequenz CATTTG enthält, bestätigt werden (Leng *et al.,* 2001). Jedoch war eine *in vivo* Bindung an eine E-Box in einer Ein-Hybrid-Analyse nicht nachzuweisen (Hilbig, 2004). Darüber hinaus konnte auch für kein weiteres APSES-Protein eine *in vivo* Bindung an die E-Box gezeigt werden.

Des Weiteren wurden in Sequenzvergleichen Übereinstimmungen zwischen dem bHLH-Bereich der APSES-Domäne von Efg1 und der N-terminalen DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Mbp1 aus *S. cerevisiae* festgestellt. Mbp1 bildet einen heterodimeren Komplex mit Swi6 (MBF, MCB-binding factor), welcher sogenannte MCB-Elemente (MluI Cell cycle box) über die palindromische Erkennungssequenz ACGCGT innerhalb von Promotoren bindet und auf diese Weise die Expression Zellzyklus-spezifischer Gene in *S. cerevisiae* reguliert (Koch *et al.,* 1993; Koch und Nasmyth, 1994; McIntosh, 1993). Da die Bindespezifität von bHLH-Proteinen aufgrund variabler Dimerisierungspartner unterschiedlich sein kann, wurde daher auch das MCB-Element als Efg1-Bindesequenz in Erwägung gezogen. In Ein-Hybrid-Experimenten konnte eine Bindung von Efg1 an das MCB-Motiv *in vivo* in *S. cerevisiae* und in *C. albicans* gezeigt werden (Doedt, 2003; Hilbig, 2004; Noffz *et al.,* 2008). Zudem wurde dies durch Gelretardierungsanalysen mit einem Oligonukleotid, welches ein dreifaches MCB-Element aufwies, bestätigt (Bußmann, 2006). Auch für das APSES-Protein StuA aus *Aspergillus nidulans* wurde eine *in vivo* Bindung an die MCB-Box nachgewiesen (Dutton *et al.,* 1997), was die MCB-Box als potentielle Erkennungssequenz von Efg1 und anderen APSES-Proteinen hervorhebt. Die Gene *YWP1* (GPI-Zellwandprotein) und *SAP2* (Aspartylprotease) zeigten in Transkriptomstudien eine starke Efg1-abhängige Regulation auf; eine Deletion des MCB-Elements in deren Promotorsequenz führte in Reportergenanalysen jedoch zu keiner veränderten Promotorregulation in Abhängigkeit von Efg1 (Doedt, 2003). Daher bleibt die Relevanz der MCB-Box als mögliches regulatorisches Efg1-Bindeelement fraglich.

Darüber hinaus konnte kein Nachweis für eine mögliche Bindung von Efg1 an ein SCB-Element (Swi4,6-dependent cell cycle box) mit der Konsensussequenz CACGAAA erbracht werden. SCB-Elemente werden von dem Heterodimer-Komplex Swi4/Swi6 (SCB-binding factor) in *S. cerevisiae* gebunden, wodurch Zellzyklus-relevante Gene induziert werden (Koch und Nasmyth, 1994).

Im Zusammenhang mit der negativen Autoregulation von *EFG1* (Abschnitt 1.3.1) wurde die Bindung von Efg1 an seinen Promotor untersucht. Durch Gelverzögerungsanalysen konnte eine Interaktion zwischen Efg1 und einem 408 bp-großen *EFG1*-Promotorfragment *in vitro* gezeigt werden (Bußmann, 2006, Kurtz, 2010). Dabei wurden die Experimente mit heterolog synthetisiertem GST-Efg1 aus *E. coli* und Protein-Rohextrakten aus *C. albicans* (Efg1-HA) durchgeführt und das Ergebnis jeweils bestätigt. Das 408 bp-*EFG1*-Promotorfragment wurde darauf in einer *in vitro* Footprint-Analyse weiter auf eine konkrete Efg1-Bindesequenz hin analysiert. Hierbei wurde eine 13 bp-Region (5´-TATGCATATATGC-3´) identifiziert, die aufgrund einer Bindung von GST-Efg1 vor einem DNAse I-Verdau geschützt blieb (Bußmann, 2006). Hingegen wurden die beiden E-Box-Sequenzen innerhalb des 408 bp-Fragments durch Efg1 nicht abgeschirmt. Diese von Efg1 gebundene Sequenz 5´-TATGCATATATGC-3´ enthält die palindromische 8 bp-Abfolge TATGCATA, die unter Einbezug der angrenzenden Sequenzumgebung in einer dreifachen direkten Wiederholung auftritt. Interessanterweise enthalten beinahe alle Promotoren der frühen Zielgene von Efg1, welche in einer Transkriptom-Kurzzeitkinetik-Analyse unter normoxischen Bedingungen identifiziert wurden, diese 8 bp-Sequenz TATGCATA und/oder deren Derivat ATGCAT (Stichternoth, 2009; Stichternoth und Ernst, 2009). MCB-Boxen konnten hingegen in den untersuchten Promotorsequenzen nicht gefunden werden. Daher wurde angenommen, dass das palindromische Motiv TATGCATA und ableitbare Sequenzen bedeutend für die Efg1-Bindung und Efg1-vermittelte Genregulation - sowohl allgemein als auch im Hinblick auf die Steuerung der negativen *EFG1*-Autoregulation - sein könnten.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist ein zentraler Regulator der Morphogenese und des Metabolismus in *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997; Doedt *et al.*, 2004). Eine große Bedeutung kommt ihm bei der Regulation des Dimorphismus, dem Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphen-Wachstumsform, zu. So verliert die *efg1*-Mutante unter nahezu allen Bedingungen die Fähigkeit zur Hyphenausbildung (Lo *et al.*, 1997), was zu einer verminderten Virulenz des Pilzes führt. Die *EFG1*-Expression unterliegt kurz nach Hypheninduktion einer negativen Autoregulation, was sich als essentiell für das echte Hyphenwachstum herausgestellt hat (Tebarth *et. al.,* 2003). Des Weiteren konnte durch *in vitro* Analysen die Bindung von Efg1 an eine 13 bp-Sequenz (5´-TATGCATATATGC-3´) des *EFG1*-Promotors gezeigt werden, welche das Palindrom TATGCATA enthält und in die *EFG1*-Promotorreprimierung involviert sein könnte. Da die molekularen Mechanismen der *EFG1*-Regulation bis heute nur ansatzweise verstanden sind, bedürfen sie weiterer Aufklärung.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es daher, die Promotorregulation von *EFG1* mit Hilfe verschiedener *EFG1*-Promotor-Deletionskonstrukte zu analysieren. Insbesondere sollte dabei auch die Bedeutung des potentiellen Efg1-Bindemotivs TATGCATA für die negative *EFG1*-Autoregulation *in vivo* untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es den Einfluss anderer Regulatoren hinsichtlich der *EFG1*-Promotoraktivität zu klären.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Bindung von Efg1 an seinen Promotor *in vivo* untersucht werden. Mittels genomweiter ChIP-chip-Analysen wurden chromosomale Binderegionen und damit direkte Zielgene von Efg1 unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen identifiziert. Basierend auf den genomweiten Efg1-Interaktionen wurden Efg1-spezifische Erkennungssequenzen ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:
Agilent Technologies (Böblingen), Ambion (Kassel), Amersham (Braunschweig), Biorad (München), B. Braun (Melsungen), Calbiochem (Bad Soden), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Pierce (Rockford), Promega (Madison), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Stratagene, WERNER BioAgents (Jena), Whatman (Maidstone, GB), Zymo Research (Freiburg). Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
DH5αF‘	F^- [Φ80Δ(*lacZ*)M15] Δ(*lacZYA-argF*) *U169 recA1 endA1 hsdR17* $r_k^- m_k^+$ *supE44 thi-1 gyrA1 relA*	Hanahan, 1983; Woodcock *et al.*, 1989
XL1-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44* lac[F’ proAB $lacI^q$ZM15 Tn10(Tet^r)]	Bullock *et al.*, 1987

2.2.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

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

Zur Herstellung von festen Nährböden wurden dem Medium 2 % Agar zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37 °C. Zur Selektion plasmidkodierter Ampicillinresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Selektion auf *lacZ*-Aktivität erfolgte durch Ausstreichen von 100 µl IPTG-Lösung (100 mM) und 20 µl X-Gal-Lösung (50mg/ml) auf eine LB-Ampicillin-Agarplatte.

2.2.3 *C. albicans*-Stämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
SC5314	prototroph	Fonzi und Irwin, 1993
CAF2-1	*URA3*/*ura3*::*imm434*	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	*ura3*::*imm434*/*ura3*::*imm434*	Fonzi und Irwin, 1993
HLC67	wie CAI4, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::*hisG*	Lo *et al.,* 1997
HLCEEFG1	wie HLC67, aber *efg1*::*hisG*/*efg1*::[*EFG1-HA-EFG1-URA3*] (pTD38-HA/*Pac*I integriert in *EFG1p*)	Noffz *et al.,* 2008
DSC11	*efg1::hisG/efg1::hisG::EFG1-dpl 200 ura3::imm434/ura3::imm434::URA3*	Park *et al.*, 2005
KLC5.1	HLC67[pTD38-EFG1/HA]-1	Klaus Lengeler
KLC5.2	HLC67[pTD38-EFG1/HA]-2	Klaus Lengeler
KLC9.1	HLC67[pTD38-EFG1/HA-ΔStuI/HpaI]-1	Klaus Lengeler
KLC9.2	HLC67[pTD38-EFG1/HA-ΔStuI/HpaI]-2	Klaus Lengeler
ES2(1)	wie CAI4, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	Eva Szafranski, 2007 (Diplomarbeit)
ES2(2)	wie ES2(1)	Eva Szafranski, 2007
ES2(3)	wie ES2(1)	Eva Szafranski, 2007
ES6(1)	wie HLC67, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p)*	Eva Szafranski, 2007 (Diplomarbeit)
ES6(2)	wie ES6(1)	Eva Szafranski, 2007
ES6(3)	wie ES6(1)	Eva Szafranski, 2007
IIHH6-4a	wie CAI4, aber *tpk1*::*hisG*/*tpk1*::*hisG*	Bockmühl *et al.,* 2001
AS1	wie CAI4, aber *tpk2*::*hisG*/*tpk2*::*hisG*	Sonneborn *et al.,* 1999
SFC4	wie CAI4, aber *sin3::hisG/sin3::hisG*	Tebarth *et al.,* 2003
NDH4	wie CAI4, aber *hda1::hisG/hda1::hisG*	Tebarth *et al.,* 2003
CCF4	*ura3:: imm434/ura3:: imm434 flo8::hisG/flo8::hisG*	Cao *et al.,* 2006
CKY157	*czf1::hisG/czf1::hisG ura3:: imm434/ura3:: imm434*	Carol Kumamoto
wt-2TA-*Bgl*II (1,2,3)	wie CAI4, aber *EFG1p*2TA-*Bgl*II-*RLUC-URA3* (pSKM46e-2TA-*Bgl*II /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-2TA-*Bgl*II (1,2,3)	wie HLC67, aber *EFG1p*2TA-*Bgl*II-*RLUC-URA3* (pSKM46e-2TA-*Bgl*II /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
wt-Δ3xEGR (1,2,3)	wie CAI4, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-Δ3xEGR (1,2,3)	wie HLC67, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit

wt-del 1 (1,2,3)	wie CAI4, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-del1-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-del1 /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-del 1 (1,2,3)	wie HLC67, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-del1-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-del1 /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
wt-del 2 (1,2,3)	wie CAI4, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-del2-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-del2 /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-del 2 (1,2,3)	wie HLC67, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-del2-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-del2 /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
wt-del 3 (1,2,3)	wie CAI4, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-del3-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-del3 /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-del 3 (1,2,3,4)	wie HLC67, aber *EFG1p*_Δ3xEGR/*Bgl*II-del3-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ3xEGR-del3 /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
wt-Δ7kb (1,2)	wie ES2(2), aber (*ACT1p-SAT1-ACT1t*)*::EFG1p*Δ (Primer : *EFG1p*-SAT1-for und *EFG1p-SAT1(-2500-neu2)*-rev)	diese Arbeit
efg1-Δ7kb (1,2,3)	wie ES6(2), aber (*ACT1p-SAT1-ACT1t*)*::EFG1p*Δ (Primer : *EFG1p*-SAT1-for und *EFG1p-SAT1(-2500-neu2)*-rev)	diese Arbeit
wt-Δ5´UTR (1,2,3)	wie CAI4, aber *EFG1p*_Δ5´UTR-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ*Stu*I-*Hpa*I /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-Δ5´UTR (1,2,3,4)	wie HLC67, aber *EFG1p*_Δ5´UTR-*RLUC -URA3* (pSKM46e-Δ*Stu*I-*Hpa*I /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
wt-Δ7xEGR (1,2,3,4)	wie CAI4, aber *EFG1p*_Δ7xEGR-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ7xEGR /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
efg1-Δ7xEGR (1,2,3,4)	wie HLC67, aber *EFG1p*_Δ7xEGR-*RLUC-URA3* (pSKM46e-Δ7xEGR /*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
tpk1-TL (1,2,3)	wie IIHH6-4a, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
tpk2-TL (1,2,3)	wie AS1, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
flo8-TL (1,2,3,4,5)	wie CCF4, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
czf-TL (1,2,3,4,5)	wie CKY157, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
sin3-TL (1,2,3)	wie SFC4, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
hda1-TL (1,2,3,4)	wie NDH4, aber *EFG1p-RLUC-URA3* (pSKM46e/*Xho*I integriert in *EFG1p*)	diese Arbeit
wt-3.6kb (1,2,3,4,5)	wie CAI4, aber 3,6 kb-*EFG1p-RLUC-URA3* (p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC*/ *Nco*I integriert in *RPS10*)	diese Arbeit

efg1-3.6kb (1,2,3,4)	wie HLC67, aber 3,6 kb-*EFG1p-RLUC-URA3* (p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC*/ *Nco*I integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
wt-1.4kb (1,2,3,4,5)	wie CAI4, aber 1,4kb-*EFG1p-RLUC-URA3* (p*EFG1p*-1.4kb_*RLUC*/ *Nco*I integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
efg1-1.4kb (1,2,3,4)	wie HLC67, aber 1,4kb-*EFG1p-RLUC-URA3* (p*EFG1p*-1.4kb_*RLUC*/ *Nco*I integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
wt-3.6kb_Δ7xEGR (1, 2,3,4)	wie CAI4, aber 3,6 kb(Δ7xEGR)-*EFG1p-RLUC-URA3* (p*EFG1p*-3.6kbΔ7xEGR_*RLUC*/ *Nco*I integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
efg1-3.6kb_Δ7xEGR (1, 2,3,4,5)	wie HLC67, aber 3,6 kb(Δ7xEGR)-*EFG1p-RLUC-URA3* (p*EFG1p*-3.6kbΔ7xEGR_*RLUC*/ *Nco*I integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
C-SAP2p(1050) (1,2,3)	wie CAI4, aber *SAP2p-RLUC-URA3* (pSAP2p-1050 (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
H-SAP2p(1050) (1,2,3)	wie HLC67, aber *SAP2p-RLUC-URA3* (pSAP2p-1050 (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
C-SAP2p(550) (1,2,3)	wie CAI4, aber *SAP2p*(550bp)-*RLUC-URA3* (pSAP2p-550 (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
H-SAP2p(550) (1,2,3)	wie HLC67, aber *SAP2p*(550bp)-*RLUC-URA3* (pSAP2p-550 (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
C-SAP2p(ΔEGR) (1,2,3,4)	wie CAI4, aber *SAP2p*ΔEGR-*RLUC-URA3* (p*SAP2p*-ΔEGR (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
H-SAP2p(ΔEGR) (1,2,3,4)	wie HLC67, aber *SAP2p*ΔEGR-*RLUC-URA3* (p*SAP2p*-ΔEGR (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
C-SAP2p(ΔEbox) (1,2,3)	wie CAI4, aber *SAP2p*ΔE-Box-*RLUC-URA3* (p*SAP2p*-ΔE-Box (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
H-SAP2p(ΔEbox) (1,2,3)	wie HLC67, aber *SAP2p*ΔE-Box-*RLUC-URA3* (p*SAP2p*-ΔE-Box (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
C-SAP2p(del1) (1,2,3)	wie CAI4, aber *SAP2p*(1050 bp-del1)-*RLUC-URA3* (pSAP2p-del1 (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit
C-SAP2p(del2) (1,2,3)	wie CAI4, aber *SAP2p*(1050 bp-del2)-*RLUC-URA3* (pSAP2p-del2 (*Nco*I) integriert in *RPS10*)	diese Arbeit

2.2.4 Medien und Anzucht von *C. albicans*

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

SD (Minimalmedium): 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose; pH 6,9 mit NaOH eingestellt

YCB-BSA: 1,17 % Yeast Carbon Base (YCB), 0,5 % BSA (10 % Stock, steril filtriert), 1% Glukose (= 2 % total; 1 % stammt aus YCB)

Zur Selektion auf Nourseothricin-Resistenz (*sat1*-Markergen; Kodierung für N-Acetyltransferase) wurde zum YPD-Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Nourseothricin (Streptothricin/clonNAT) in einer Konzentration von 200 µg/ml zugegeben. Zur Herstellung von festen Nährböden wurden dem Medium 2 % Agar zugegeben. Die Anzucht von *Candida albicans* erfolgte i. d. R. bei 30 °C.

2.2.5 Hypheninduktion bei *C. albicans* im flüssigen Medium

C. albicans ÜN-Kulturen, welche in 5 ml YPD bei 30 °C und 110 Upm gewachsen sind, wurden mit sterilem Wasser gewaschen (5 min, 3500 Upm) und in 5 ml YP resuspendiert. Im Anschluss wurde das auf 37 °C vortemperierte YP-Medium (i. d. R. 40 ml) auf eine OD_{600} = 0,2 inokuliert und mit 10 % Pferdeserum (v/v) versetzt. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C und 110 Upm induziert. Die Zellernte erfolgte falls nicht anders vermerkt nach 1,5 h.
Zur Hyphen-Quantifizierung wurden jeweils 100 - 200 Zellen alle 20 min nach Hypheninduktion ausgezählt.

2.3 Plasmide und Primer

2.3.1 Plasmide

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmide	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pMOS-Blue	*E. coli* Klonierungsvektor	Fa. Amersham
pGEM-T	*f1ori, ApR, lacZ, ori*	Promega GmbH, Mannheim
pSKM46e	*EFG1p-RLUC*; URA3-Marker	Tebarth *et at.,* 2003
pES1	anstatt CATATA eine *Bgl*II-Schnittstelle in pSKM46e eingefügt	Eva Szafranski, 2007 Diplomarbeit
pES2	*RLUC* aus pRL-null in Clp10 zwischen *RP10* und *URA3*-Marker	Eva Szafranski, 2007 Diplomarbeit
pRL-null	T7p-RLUC; MCS	Fa. Promega
pFC1	*ACT1p-sat1-ACT1t* in pUC18	Setiadi *et al.*, 2006
pSKM46e-Δ*Stu*I-*Hpa*I	pSKM46e-*Stu*I-*Hpa*I geschnitten mit *Stu*I und *Hpa*I (Δ5´UTR); dann rezirkularisiert	Klaus Lengeler
pSKM46e-2TA-*Bgl*II	Mutagenese-PCR auf pSKM46e mit 3xR-Box EFG1p_2 AT-*Bgl*II_for und 3xR-Box EFG1p_2 AT-*Bgl*II_rev	diese Arbeit
pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II	Mutagenese-PCR auf pSKM46e mit	diese Arbeit

	3xR-Box *Bgl*II insert For und 3xR-Box *Bgl*II insert Rev	
pSKM46e-Δ3xEGR-del1	Mutagenese-PCR auf pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II mit Efg1-408bp-Muta 1_for und Efg1-408bp-Muta 1_rev	diese Arbeit
pSKM46e-Δ3xEGR-del2	Mutagenese-PCR auf pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II mit Efg1-408bp-Muta 2_for und Efg1-408bp-Muta 2_rev	diese Arbeit
pSKM46e-Δ3xEGR-del3	Mutagenese-PCR auf pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II mit Efg1-408bp-Muta 3_for und Efg1-408bp-Muta 3_rev	diese Arbeit
pSKM46e-Δ7xEGR	Mutagenese-PCR auf pSKM46e mit EFG1p-del 7xARE-for EFG1p-del 7xARE-rev	diese Arbeit
p*EFG1p*-1.4kb_*RLUC*	1,37 kb *EFG1p*-Fragment aus pSKM46e amplifiziert mit EFG1p_1370bp_XmaI-for-2 und EFG1p_1370bp_Nhe1-rev, ligiert in pES2 (*Xma*I, *Nhe*I)	diese Arbeit
p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC*	3,6 kb *EFG1p*-Fragment aus pSKM46e amplifiziert mit EFG1p_-3400bp_XmaI-for und EFG1p_Inkl.minEFG1p_NheI-rev, ligiert in pES2 (*Xma*I, *Nhe*I)	diese Arbeit
p*EFG1p*- 3.6kbΔ7xEGR_*RLUC*	Mutagenese-PCR auf p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC* mit EFG1p-del 6xARE-for und EFG1p-del 6xARE-rev	diese Arbeit
pSAP2p-1050	*SAP2p*(1050 bp)-*RLUC*-Fusion mit *CaRPS10*-Gen	B. Hube
pSAP2p-550	*SAP2p*(550 bp)-R*LUC*-Fusion mit Ca*RPS10*-Gen	B. Hube
p*SAP2p*-ΔEGR	Mutagenese-PCR auf pSAP2p-1050 mit SAP2p-delATGCAT-vor und SAP2p-delATGCAT-rück	diese Arbeit
p*SAP2p*-ΔE-Box	Mutagenese-PCR auf pSAP2p-1050 mit SAP2p-delCAAATG(E-box)-vor und SAP2p-delCAAATG(E-box)-rück	diese Arbeit
pSAP2p-del1	Mutagenese-PCR auf pSAP2p-1050 mit *SAP2p*-Mutagenese-1_vor und *SAP2p*-Mutagenese-1_rück	diese Arbeit
pSAP2p-del2	Mutagenese-PCR auf pSAP2p-1050 mit *SAP2p*-Mutagenese-2_vor und *SAP2p*-Mutagenese-2_rück	diese Arbeit

2.3.2 Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Primer	**Sequenz**
3xR-Box EFG1p_2 AT-*Bgl*II_for	5´-CTAATATACAAGTATATATTAATATATTAATA TATGAGATCT CCAATTAGCAATACTGC-3´
3xR-Box EFG1p_2 AT-*Bgl*II_rev	5´-GCAGTATTGCTAATTGGAGATCTCATAT ATTAATATATTAATATATACTTGTATATTAG-3´
Sequenz.1974-EFG1-Promotor-vor	5´-AAGGAAAGAGGCAAAACCG-3´
EFG1p-408bp-Muta 1_for	5´-AGCTTTCACTACAACCGCAATACTGCACAATAACA-3´
EFG1p-408bp-Muta 1_rev	5´-TGTTATTGTGCAGTATTGCGGTTGTAGTGAAAGCT-3´
EFG1p-408bp-Muta 2_for	5´-CAAGTATAAGATCTTACCGCTTATTATGCATTCAGTC-3´
EFG1p-408bp-Muta 2_rev	5´-GACTGAATGCATAATAAGC GGTAAGATCTTATACTTG-3´
EFG1p-408bp-Muta 3_for	5´-GCATTTCGTGATAAAATGGGTGAGAAGTAGTAGAAGG-3´
EFG1p-408bp-Muta 3_rev	5´-CCTTCTACTACTTCTCA CCCATTTTATCACGAAATGC-3´
EFG1p-Sequenzier_vor	5´-TGTGTGTGTATGCGTTAGTC-3´
3xR-Box *Bgl*II insert For	5´-GAAACTAATATACAAGTATAAGATCTTACCAATTAGCAATACTGC-3´
3xR-Box *Bgl*II insert Rev	5´-GCAGTATTGCTAATTGGTAAGATCTTATACTTGTATATTAGTTTC-3´
EFG1p-SAT1-for	5´-ACCTACATTCCTTTCTCCCAAAATGTATAAATCACGAGAGCCGAGAGGCTT TGTTTACTCTTCCTTGGTCGGACATGAGC**GGATCCGCGTCAAAACTAGAG**-3´
EFG1p-SAT1(-2500-neu2) -rev	5´-GAGTCACCAAACTCACATTTGGATATACATTATACACATGCCACAAATCT TTCCAACTCTTTTCTTGCTATCACTACCTG**TCGACATTTTATGATGGAATG**-3´
EFG1p-del 7xARE-for	5´-CCAAATGTGAGTTTGGTGACCCACACCATGCAATCAATAC-3´
EFG1p-del 7xARE-rev	5´-GTATTGATTGCATGGTGTGGGTCACCAAACTCACATTTGG-3´
SAT1-term_for	5´-ACGAAACAGCGATGTACTGG-3´
ACT1t_for	5´-TCTTGTTTGATGATTCATCCC-3´
Rück_Rluc_Kolo	5´-CACTGCGGACCAGTTATCATC-3´
EFG1p_1370bp_XmaI-for-2	5´-TCCCCCCGGGTGATAGCAAGAAAAGAGTTGG-3´
EFG1p_1370bp_Nhe1-rev	5´-CTAGCTAGCCTATTTGATAGATGATAGATTATTC-3´
EFG1p_-3400bp_XmaI-for	5´-TCCCCCCGGGTCATTAACCAACAGCCAGAGTC-3´
EFG1p_Inkl.minEFG1p_NheI-rev	5´-CTAGCTAGCTCGGATCCATATGACGTCGAC-3´
1370bpEFG1p-Seq.GATC-for	5´-TCTGTTTAAGGATAATGATCTG-3´
1370bpEFG1p-Seq.GATC-imRLUC-rev	5´-TTTCTGCATGTTTTTCTGAATC-3´
***SAP2p*:**	
SAP2p-delATGCAT-vor	5´-GTTCAAGGTGTTTACAACTAAAACAG-3´
SAP2p-delATGCAT-rück	5´-CTGTTTTAGTTGTAAACACCTTGAAC-3´
SAP2p-Sequenzier(ARE-Box)-vor	5´-AGAAACTTGCACGGCACC-3´
SAP2p-delCAAATG(E-box)-vor	5´-GACACACTCACATTGTTACCCCTTAAAAC-3´
SAP2p-delCAAATG(E-box)-rück	5´-GTTTTAAGGGGTAACAATGTGAGTGTGTC-3´

SAP2p-Sequenzier(E-Box)-rück	5´-TGGCTTGTTGTTGACAGGC-3´
Kolo-PCR SAP2p-vor	5´-TAGAATGATTCTGGATACC-3´
Kolo-PCR SAP2p-hinterRPS10-rück	5´-TGGAAAAGGTAATAGAGAG-3´
SAP2p-Mutagenese-1_vor	5´-CTTCAAATTTTCTTTCCCCGTCAACAAACACAAGTTTC-3´
SAP2p-Mutagenese-1_rück	5´-GAAACTTGTGTTTGTTGACGGGGAAAGAAAATTTGAAG-3´
SAP2p-Mutagenese-2_vor	5´-CTTCAAATTTTCTTTCCCCCGATAGAAATAATGATTATC-3´
SAP2p-Mutagenese-2_rück	5´-GATAATCATTATTTCTATCGGGGGAAAGAAAATTTGAAG-3´
***SAP2p* (EMSA):**	
SAP2p(1050bp)-for	5´-ACTTCAAATTTTCTTTCCC-3´
SAP2p(+600bp)-rev	5´-AGAAAGGTTAAAAGTTTAGTC-3´
SAP2p(-550bp)-for	5´-ACTTTTAACCTTTCTAGTACC-3´
SAP2p(1050bp)-rev	5´-GATAAATGGTGATGTTTAGTGG-3´
ChIP:	
EFG1p-1-for	5´-ACCTGAGCAACTAATGTGGG-3´
EFG1p-1-rev	5´-GGTTAACCCCTTTGTGTCC-3´
EFG1p-2-for	5´-ACTGTGTCAGTTTGGTAGC-3´
EFG1p-2-rev	5´-TCCCAACTTTAATTCCTTCC-3´
EFG1p-3-for	5´-AACTCAAAGATTTAGTACGG-3´
EFG1p-3-rev	5´-AGTGAGAAGTAGTAGAAGG-3´
EFG1p-4-for	5´-TTCTGGGCAAAAGTTAAGAC-3´
EFG1p-4-rev	5´-TTGACCCTTGTGAGACCTC-3´
EFG1p-5-for	5´-CACATGCCACAAATCTTTCC-3´
EFG1p-5-rev	5´-TTTAAGGAAACGAGACGAGC-3´
EFG1p-6-for	5´-GTTTCCTTCCTGTTCTACCG-3´
EFG1p-6-rev	5´-ACGTACACAGAATTAGTTTGG-3´
EFG1p-7-for	5´-AATGAGATAATGCAGCAGAG-3´
EFG1p-7-rev	5´-AATGAGATAATGCAGCAGAG-3´
EFG1p-8-for	5´-GGATTACACAAACTATACGG-3´
EFG1p-8-rev	5´-AGTGCCATGCATTATATGCC-3´
EFG1p-9-for	5´-ATGAATAACTCGAGTCGTGC-3´
EFG1p-9-rev	5´-ACAGGTTCATATGGATATGG-3´
EFG1p-10-for	5´-AACATATTTAGTGCTGCTAC-3´
EFG1p-10-rev	5´-TGTCGACGTTGTTATTTGC-3´
EFG1p-11-for	5´-TCGATGCATTGCATACGTCC-3´
EFG1p-11-rev	5´-TCATTCATGCTCATGCACATC-3´
EFG1p-12-for	5´-TACTGTTGTTGTTAGTCAGC-3´
EFG1p-12-rev	5´-TTCAACAATTTGCTCTGTGC-3´
EFG1p-13-for	5´-ACAACACCAACACTGAAGGC-3´
EFG1p-13-rev	5´-TATGCAATGTCAGAGACACG-3´
EFG1p-14-for	5´-CTCATATTTCCTCGTGTTCC-3´
EFG1p-14-rev	5´-AGCTTGTGGGCATATCTGC-3´
EFG1p-15-for	5´-AATCTGGTCGGCGATAAGAG-3´
EFG1p-15-rev	5´-TAGCCGTTTGCGTGTGTGG-3´
EFG1p-16-for	5´-TACTGCAAATGACGCTTGCG-3´

EFG1p-16-rev	5´-TTCCAACTGACAATCTCACC-3´
EFG1p-17-for	5´-TTGGGAGAAAGGAATGTAGG-3´
EFG1p-17-rev	5´-TTGGCTTGTAAGTTCCTGCC-3´
EFG1p-18-for	5´-TACTAGACTTCACAGCTCAG-3´
EFG1p-18-rev	5´-ATCTCAGGTAAAGCTCTTCC-3´
408: EFG1p-in408bp-for (19)	5´-TTGTCTTAACTTTTGCCCAG-3´
408: EFG1p-in408bp-rev (19)	5´-GTATTGATTGCATGGTGTGG-3´
ACT1p(313) hin (Doedt, 2003)	5´-GTAGTGTGTGTGCACTGCC-3´
ACT1p(313) her (Doedt, 2003)	5´-CCACCGTCCATTTTGAATGA-3´
qPCR:	
ACT1(RT)-f	5´-TTGGATTCTGGTGATGGTGT-3´
ACT1(RT)-r	5´-TGGACAAATGGTTGGTCAAG-3´
1RTEFG1	5´-ACCTTGAGGGATACCAGCAG-3´
2RTEFG1	5´-GGTGGCAGTAATGTGTCTGG-3´
RT_TCC1_for	5´-AACCAAATGGAGGACCACAT-3´
RT_TCC1_rev	5´-CAGGAGCACTATTGTTGGGA-3´

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

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

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab (ausgehend von 2 ml Übernachtkultur) wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab (ausgehend von 50 ml Übernachtkultur) erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Midi-Kits (Qiagen) ebenfalls nach Herstellerangaben. Die eluierte Plasmid-DNA wurde für Restriktionsanalysen und Transformationen oder direkt zur DNA-Sequenzierung eingesetzt.

2.4.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*

Chromosomale DNA aus *C. albicans* wurde nach einer modifizierten Methode von Sherman *et al.,* (1986) isoliert. Die Zellen wurden in 5 ml YPD innolukiert, über Nacht bei 30 °C und 110 Upm angezogen und im Anschluss mit 5 ml destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 400 µl SCE/DTT/Zymolyase-Lösung (1 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA/ pH 5,8; 5 mM 1,4-Dithiothreitol; 88 µg/ml Zymolyase (100T)) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die erhaltenen Sphäroplasten abzentrifugiert (5 min, 4000 Upm) und in 500 µl 50 mM EDTA (pH 8,0) + 50 µl 10 % SDS resuspendiert. Zur Lyse der Zellen und Denaturieung der Proteine erfolgte eine Inkubation bei 65 °C für 30 min. Die Suspension wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Zugabe von 100 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 6,0) wurden die Proteine für 30 - 90 min auf Eis gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13000

Upm, 4 °C) wurde der DNA enthaltende Überstand mit 900 µl abs. Ethanol gemischt und abzentrifugiert (15 min, 13000 Upm, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde in 400 µl RNAse-Lösung (150 mM Natriumacetat pH 5,9; 200 µg/ml RNAse A; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde zur DNA-Extraktion ein Volumen Phenol-Chloroform (400 µl) zugegeben und die Probe gemischt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, mit 900 µl abs. EtOH versetzt und die DNA ÜN bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden für 20 min bei 13000 Upm (4 °C) zentrifugiert, das DNA-Pellet getrocknet und in 60 -120 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen.

2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Hypheninduktion wurden 100 bzw. 50 ml *C. albicans*-Kulturen (-1 min, 10 min, 20 min: 100 ml; 60 min, 90 min: 50 ml) aus einem 700 ml-Gesamtkulturansatz geerntet (5 min, 3500 Upm). Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet im Restüberstand resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden langsam in flüssigen Stickstoff getropft, so dass gefrorene Zellkügelchen entstanden. Bis zur weiteren Präparation wurden diese bei -80 °C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die gefrorenen Zelltropfen einer Probe mit einer gekühlten Carbid-Kugel (Ø 7 mm) in ein Stickstoff-gekühltes Teflongefäß gegeben und in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) für 2 min bei 2600 Upm aufgeschlossen. Der so erhaltene Zellstaub wurde anschließend zügig in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min kräftig geschüttelt. Zur Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 Upm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,4 Volumen Chloroform gemischt. Die Proben wurden 15 sec mit der Hand geschüttelt, anschließend 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und erneut zentrifugiert (5 min, 13000 Upm). Die obere, klare Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 Upm) wurde das RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol (verdünnt mit DEPC-Wasser) gewaschen (10 min, 13000 Upm). Der Überstand wurde abgenommen, das RNA-Pellet luftgetrocknet und schließlich in 500 µl DEPC-Wasser (0,1 % DEPC) aufgenommen. Durch Zugabe von 500 µl LiCl-Puffer (4 M LiCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA) wurde die RNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach dem Auftauen wurde die RNA-Probe zentrifugiert (30 min, 13000 Upm) und das Pellet anschließend zweimal mit 1 ml bzw. mit 500 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen (jeweils 10 min, 13000 Upm). Abschließend wurde das RNA-Pellet für 15 min luftgetrocknet und in 80 - 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

2.4.4 Restriktionsverdau

Für die Restriktion von DNA wurden Enzyme der Firmen Roche und New England Biolabs benutzt. Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben unter Nutzung der mitgelieferten Puffer verwendet.

2.4.5 Ligation

Für Ligationen wurde das Quick Ligation-Kit (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 50 ng Plasmid-DNA und die dreifache molare Menge des zu klonierenden Fragments eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 25 °C für 5 min.

2.4.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 – 2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde Ultra-Pure-Agarosepulver (Invitrogen) in 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) mit 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml Lösung in der Mikrowelle aufgekocht. Die Elektrophorese der mit Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versehenen Proben erfolgte bei 24 – 90 Volt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte unter UV-Licht (254 nm).

2.4.7 DNA-Größenstandard

Als Größenstandard in Agarosegelen wurde λ-DNA (MBI-Fermentas) verwendet, welche mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI/*Hin*dIII oder nur mit *Hin*dIII geschnitten wurde. Bei der *Eco*RI/*Hin*dIII-Restriktion entstanden DNA-Fragmente der folgenden Größe (bp): 21226, 5148, 4973, 4266, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 891, 564, 125. Die *Hin*dIII-Restriktion lieferte folgende Fragment-Größen (bp): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125. Alternativ wurde als Größenstandard eine 1 kb DNA-Leiter (MBI-Fermentas) mit folgenden definierten Bandengrößen verwendet (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.

2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.4.9 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die DNA- und RNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz: $A_{260} \cdot \varepsilon = c$ [ng/µl]. Eine Extinktion von $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA sowie 33 µg/ml Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993).

2.4.10 Abschätzung der DNA-Konzentration im Agarosegel

Nach Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese wurde die Konzentration der DNA-Banden durch Vergleich mit Banden des Größenstandards ähnlicher Größe und bekannter Konzentration abgeschätzt. Die Konzentration chromosomaler DNA wurde im Vergleich zu bekannten Mengen ungeschnittener DNA des Bakteriophagen λ (100 ng, 200 ng und 400 ng) abgeschätzt.

2.4.11 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungsanalysen erfolgten in Auftragsarbeit durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz). Dazu wurden 1 - 3 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl H_2O eingeschickt.

2.4.12 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen durch Southern-Blot-Analyse

(Southern, 1977; Sambrook *et al.*, 1989)

2.4.12.1 Sondenmarkierung

Die Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit" der Firma Roche. Pro Reaktionssansatz wurde etwa 500 ng DNA zunächst 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP-Labeling-Mixture und 1 µl Klenow-Fragment erfolgte die Markierung der Sonden-DNA in einem Endvolumen von 20 µl bei 37 °C über Nacht (20 h). Danach wurden dem Ansatz 1/10 Volumen 4 M LiCl und 2,5 Volumen abs. EtOH zugefügt und die markierte DNA für mindestens 30 min bei -20 °C/-70 °C gefällt. Die DNA wurde luftgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst. Die Konzentration der Sonde bzw. die Markierungsqualität wurde vor der Hybridisierung im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe mit markierter Kontroll-DNA abgeschätzt.

2.4.12.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vakuum-Blot

Nach einer Konzentrationsabschätzung der chromosomalen DNA im Agarosegel im Vergleich zu ungeschnittener λ-DNA (100 ng; 200 ng; 400 ng) wurden 1,5 µg der zu analysierenden DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (jeweils 20 U) in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 30 bis 48 h geschnitten. Anschließend wurde die DNA gefällt, in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und schließlich in einem 0,8 %igen Agarosegel über Nacht bei 25 V aufgetrennt. Daraufhin erfolgte der DNA-Transfer auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham) in einer Vakuum-Blotkammer (LKB 2016 VacuGene von Pharmacia). Nach dem Anlegen eines konstanten Vakuums (40 cm H_2O) erfolgte dazu zunächst eine 5-minütige Denaturierung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH). Dieser folgte eine ebenfalls 5-minütigen Neutralisierung (3 M NaAc, pH 5,5) und schließlich der Transfer der DNA auf die Membran für 45 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat/ pH 7). Zur Fixierung der DNA wurde die Membran nach einer kurzen Trocknungszeit für 3 min unter UV-Licht (312 nm) bestrahlt.

2.4.12.3 Hybridisierung und Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Hybond N-Nylonmembran (Amersham) erfolgte zunächst eine Inkubation für 1 - 3 h in etwa 45 ml Prähybridisierungslösung (5x SSC; 1x NRB2; 0,02 % SDS; 0,1 % N-Laurylsarkosinat) bei 68 °C. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde für 10 min bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und in 5 ml Prähybridiesierungslösung gegeben. Die anschließende Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 68 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für je 5 min mit NRW1-Puffer (2x SSC; 0,1 % SDS) bei RT gewaschen. Darauf folgten zwei 15-minütige Waschschritte mit NRW2-Puffer (0,1x SSC; 0,1 % SDS) bei 68 °C. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran kurz mit NRB1-Puffer abgewaschen und für 60 min in 1x NRB2-Puffer bei RT inkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation mit 4 µl Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Antikörper (Roche) in 20 ml 1x NRB2 für 45 min bei RT an. Darauf folgten zwei Waschschritte in NRB1-Puffer für jeweils 15 min. Nach kurzer Äquilibrierung der Membran in NRB3-Puffer erfolgte die Detektion mit 45 µl NBT (50 mg/ml in 70 % DMF) und 35 µl X-Phosphat (50 mg/ml in 100 % DMF) in 10 ml NRB3-Puffer im Dunkeln. Durch die alkalische Phosphatase wurde das Substrat (NBT + X-Phosphat) zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt und die DNA-Fragmente wurden auf diese Weise sichtbar.

NRB1: 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl/ pH 7,6 mit NaOH-Plätzchen

NRB2 (10x): 10 % (w/v) Blocking Reagent (Roche) in NRB1-Puffer

NRB3: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 10 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$

2.4.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.4.13.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis und Faloona (1987) diente zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt oder es wurde ein Gradientenzykler (Mastercycler pro) von Eppendorf verwendet. Ein PCR-Reaktionsansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl und enthielt: 10 - 150 ng DNA-Template, X µl ddH_2O, 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 10 mM), je 1 µl (20 µM) des 5'- und 3'-Primers, 5 µl 10x Puffer und 2 - 5 U Polymerase. Für Verifizierungsanalysen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase von NEB nach Herstellerangaben eingesetzt. PCR-Fragmente, die für Klonierungen oder Transformationen bestimmt waren, wurden mit der Expand™ High Fidelity-Polymerase von Roche nach Herstellerprotokoll amplifiziert. Statt der üblichen 32 Zyklen wurden für präparative DNA-Amplifikationen 25 Zyklen gefahren. Die Annealing-Temperaturen, sowie Elongationszeiten wurden den verwendeten Primern bzw. der erwarteten PCR-Produktgröße angepasst. Die PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt, wenn sie für Klonierungen und Transformationen eingesetzt wurden.

2.4.13.2 Kolonie-PCR

Zur Verifizierung integrierter DNA wurde eine PCR mit ganzen Zellen einer Kolonie durchgeführt. Hierzu wurde etwas Zellmaterial einer Einzelkolonie in 40 µl 0,02 M NaOH-Lösung resuspendiert und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurde die Suspension auf Eis gelagert. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden 4 µl der Zell-Suspension eingesetzt, wobei die Taq-Polymerase von NEB nach Herstellerangaben benutzt wurde.

2.4.13.3 Mutagenese-PCR

Der gezielte Austausch einzelner Basen sowie Sequenz-Deletionen erfolgten mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis-Kit (Stratagene). Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Elongationszeit wurde der Größe des Plasmid-Templates angepasst. Nach der Amplifikation wurden 10 U *Dpn*I zum Reaktions-Ansatz zugegeben und dieser bei 37 °C für 1 h inkubiert. Hierdurch wurde die methylierte Template-DNA selektiv abgebaut. Danach wurden 4 - 12 µl des Mutagenese-Ansatzes in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.4.13.4 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR basiert auf dem Prinzip einer normalen PCR, jedoch ermöglicht sie im Vergleich zur DNA-Endpunktbestimmung einer herkömmlichen PCR eine Quantifizierung der DNA während der gesamten Amplifikation, also in Echtzeit. Die Quantifizierung der DNA wird dabei durch Fluoreszenzmoleküle ermöglicht, die an das gebildete DNA-Produkt binden, was zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, welcher sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. SYBR Green wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert bei 520 nm. Dabei ist die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs 200-fach höher als die des freien SYBR Green. Aufgrund der sequenzunspezifischen Bindeeigenschaft von SYBR Green muss letztendlich die Spezifität des Produkts mittels einer Schmelzkurvenanalyse überprüft werden.

Synthese von Komplementär-DNA

Um den Transkriptspiegel der zu analysierenden Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmen zu können, muss die mRNA zunächst in komplementär-DNA (cDNA) revers transkribiert werden. Dazu wurde die isolierte RNA zunächst mit DNase behandelt bevor sie in die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt wurde.

(1) DNase-Behandlung

Wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, wurde zunächst die Gesamt-RNA aus *C. albicans* isoliert. Es folgte eine DNase-Behandlung (TURBO DNase Kit, Ambion) mit 8 µg Gesamt-RNA, 2 µl 10x DNase I Puffer, 1 µl DNase und DEPC-MilliQ in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert und im Anschluss unter Verwendung des RNA Clean-up-Kits (Zymoresearch) nach Herstellerangaben aufgereinigt und 2 Mal mit jeweils 10 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

(2) Reverse Transkription

1,5 µg der aufgereinigten RNA wurden mit 2 µl Oligo(dT) (RETROscript® First Strand Synthesis Kit for RT-PCR, Ambion) und Nuklease-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 3 min bei 70 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Den Proben wurde für die anschließende Reverse Transkription ein Mix, bestehend aus den folgenden Komponenten, zugegeben (RETROscript® Kit, Ambion; SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen):

- 2 µl 10x RT Puffer
- 4 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl RNase Inhibitor
- 1 µl SuperScript™ II ReverseTranskriptase

Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend bei 92 °C für 10 min hitzeinaktiviert.

Für jede Probe, die für die quantitative RT-PCR eingesetzt wurde, wurde auch eine so genannte „NoRT´´-Kontrolle angesetzt. Dadurch sollten die RNA-Proben nach DNase-

Behandlung auf eventuell nicht vollständig verdaute kontaminierende DNA überprüft werden. Hierzu wurde ein paralleler zweiter RNA-Ansatz jeder DNase-behandelten RNA-Probe ebenfalls mit 2 µl Oligo (dT) versetzt, mit DEPC-MilliQ auf 12 µl aufgefüllt und bei 70 °C denaturiert. Danach wurden die Ansätze lediglich mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt. Diese „NoRT"-Proben wurden später ebenfalls in der quantitativen RT-PCR gemessen.

Quantitative RT-PCR Analyse

Für die quantitative Real-Time-PCR wurde der Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix von Agilent Technologies verwendet. Die Messungen erfolgten in einem Mx3000P (Stratagene) in 96-well PCR Platten (Applied Biosystems, Frankfurt). Der Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (2,5 ml) wurde mit 75 µl ROX (1:500 verdünnt) gemischt und konnte bis zu 6 Monate lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden. ROX dient als passiver Referenzfarbstoff und wird benutzt um leichte Volumenunterschiede zwischen den einzelnen Reaktionsansätzen rechnerisch ausgleichen zu können.
Die - wie in diesem Abschnitt zuvor beschrieben - synthetisierte cDNA wurde 1:10 mit DEPC-MilliQ verdünnt und letztendlich in den folgenden Reaktionsansatz eingesetzt:

- Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (+ ROX) 12,5 µl
- Forward primer [10 pmol/µl] 1,25 µl
- Revers primer [10 pmol/µl] 1,25 µl

} Master-Mix

- cDNA (1:10) 10µl

Σ 25 µl

Die verwendeten Primer wurden entweder mit Hilfe des Programms „GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design" (https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer) oder mit dem Programm „Primer3" (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) ausgewählt. Es wurde ein Master-Mix bestehend aus Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (+ ROX) und den Primern hergestellt, wovon 15 µl zuerst auf die Wells verteilt wurden. Anschließend wurde die cDNA (1:10) hinzupippetiert. Jede cDNA-Probe wurde in einer Dreifachbestimmung (Triplikat) oder zumindest in einer Zweifachbestimmung (Duplikat) gemessen. Für die Bestimmung des relativen Transkriptspiegels eines Gens wurden mindestens zwei biologische Replikate analysiert. Als Referenzgen diente Aktin. Für die Normalisierung des Transkriptspiegels wurden somit alle cDNA-Proben auch mit den Primern ACT1(RT)-for und ACT1(RT)-rev angesetzt. Um die Primer-Effizienz für jedes untersuchte Gen zu bestimmen, wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve aus fünf cDNA-Verdünnungsschritten von 1:10 bis 1:100000 erstellt (jeweils Triplikate). Als Template diente ein cDNA-Pool aus den zu analysierenden cDNA-Proben. Aus der Steigung der Standardkurve konnte die Effizienz mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt werden: Effizienz = $10^{-(1/\text{Steigung})}$.
Von jedem Primerpaar wurde außerdem eine Kontrolle ohne cDNA (ersetzt durch 10 µl DEPC-MilliQ) in einer Zweifachbestimmung gemessen (No Template Control, NTC), um Primer-Dimerprodukte oder auch DNA-Kontaminationen ausschließen zu können.
Folgendes Programm (Three-Step Cycling) wurde für die Real-Time-PCR benutzt:

Aktivierung der Taq Polymerase	95 °C für 10 min	
Denaturierung	95 °C für 30 sec	} 40 - 45 x
Annealing	60 °C für 1min	
Extension	72 °C für 30 sec	

Direkt im Anschluss an den PCR-Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte durchgeführt. Dazu wurden die Reaktionsansätze zunächst für 1 min bei 95 °C erhitzt (Denaturierung der PCR-Produkte). Darauf wurde die Temperatur auf 55 °C abgesenkt, gefolgt von einer stetigen Erhöhung der Temperatur von 55 °C bis 95 °C (0,2 °C/sec), wobei eine kontinuierliche Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte. Beim Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts ist dieses zu 50 % zu Einzelsträngen denaturiert. Dies äußert sich durch einem drastischen Fluoreszenzabfall bedingt durch die Freisetzung des zuvor gebundenen SYBR Green. Nebenprodukte treten als weiterer Peak mit einer anderen Schmelztemperatur auf.

Zur Auswertung einer Real-Time-PCR wurde der Threshold Cycle (Ct-Wert) der einzelnen Reaktionen verwendet. Der Ct-Wert gibt diejenige Zyklenzahl an, bei der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal signifikant übersteigt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase und wird nicht durch limitierende Faktoren, wie Nukleotid- oder Primermangel oder ein Nachlassen der Enzymaktivität beeinflusst. Die Berechnung des relativen Transkriptspiegels erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{relativer Transkriptlevel (RTL)} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Aktin}})^{\text{CtAktin}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\text{CtZielgen}}}$$

2.5 Transformation

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

Mittels einer Rubidiumchlorid-Behandlung erhielten *E. coli*-Zellen die Kompetenz freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium mit einer *E. coli* (DH5α)-Übernachtkultur auf eine OD_{600} von ~ 0,1 inokuliert. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 bei 37 °C angezogen und anschließend für 15 min bis 2 Stunden auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (10 min, 3500 Upm, 4 °C) wurde das Zellpellet in 20 ml eiskalter RF1-Lösung (100 mM RbCl; 50 mM $MnCl_2$; 10 mM $CaCl_2$; 30 mM Kaliumacetat; 15 % Glycerin/ pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert und für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 4 ml eiskalter RF2-Lösung (10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM $CaCl_2$; 15% Glycerin/ pH 6,8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße verteilt (100 bis 300 µl Aliquots), in Flüssig-Stickstoff schockgefroren und/oder direkt bei -70 °C gelagert.

2.5.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983). Hierzu wurden 100 µl Rubidiumchlorid-kompetente *E. coli*-Zellen (DH5αF') 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden etwa 10 - 200 ng Plasmid-DNA zu der Zellsuspension gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec und eine 2-minütige Lagerung auf Eis. Zur Regeneration wurde die Zellsuspension mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 30 min bis 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5min, 5000 Upm), im Restmedium resuspendiert und auf LB-Selektionsmedium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert. Es folgte eine ÜN-Inkubation bei 37 °C.

2.5.3 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte nach einer Lithiumacetat-Methode nach Mitchell (Wilson *et al*., 2000). Dazu wurden 50 ml YPD mit einer *C. albicans*-Übernachtkultur auf eine OD_{600} von etwa 0,15 inokuliert (1/10 Volumen der ÜN-Kultur). Nach 4 h Inkubation bei 30 °C (110 Upm) wurden die Zellen in der exponentiellen Phase (OD_{600} = 0,5 - 0,8) abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm). Das Pellet wurde mit 5 ml LATE-Puffer (0,1 M LiAc; 10 mMTris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 0,5 ml LATE-Puffer resuspendiert. Pro Transformations-Ansatz wurden zu 100 µl Zellsuspension 5 µl Heringssperma-DNA (10mg/ml) und i. d. R. 4 - 5 µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkt in einem Volumen von 30 - 70 µl hinzugefügt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG3350 (w/v) in LATE-Puffer) zugegeben, kurz gemischt und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm), in 5 ml YPD resuspendiert und zur Regeneration für 2 - 4 Stunden bei 30 °C und 110 Upm inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) wurde das Zellpellet in 80 µl sterilem Wasser resuspendiert, auf Selektivmedium ausplattiert und für 2 - 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Präparation von Rohextrakten aus *C. albicans*

20 - 50 ml *C. albicans*-Kulturen (OD_{600} = 0,6 - 1) wurden abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm, 4 °C), anschließend in 1 ml dH_2O resuspendiert und in 1,5 ml Gefäße oder in 2 ml Cryoröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4000 Upm, 4 °C) wurde das Zellpellet über Nacht bei -20 °C eingefroren. Danach wurde das Pellet in 300 - 500 µl Lysis-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X 100; 1 Tablette Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini/10 ml) aufgenommen und mit etwa einem Volumen Glasperlen versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Rütteln auf dem Vibrax (VX

2E, Janke & Kunkel) für zweimal 12 - 15 min auf höchster Stufe bei 4 °C. Zwischen den beiden Aufschluss-Zyklen wurden die Zellen für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Glasperlen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (8 min, 13000 Upm) abgetrennt und der Überstand bei -70 °C (Luziferase-Proben) oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Diese beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brillant Blue G 250 sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Zu 800 µl dH_2O und 200 µl „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) wurden 1 - 5 µl Rohextrakt hinzugegeben, der Ansatz gemischt und für 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Doppelbestimmung). Die anschließende Messung erfolgte in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Standard wurde jeweils eine Eichgerade mit 1 - 18 µg BSA erstellt.

2.6.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die Luziferase-Aktivität von *C. albicans*-Rohextrakten wurde mittels des „Renilla Luciferase Assay Systems“ der Firma Promega in einer Doppelbestimmung ermittelt. Die Rohextrakte wurden wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben ausgehend von einer 40 - 50 ml Kultur gewonnen. Das Zellpellet wurde jedoch in 400 - 500 µl 1x Renilla Luciferase Assay Lysis-Puffer (1:5 mit ddH_2O verdünnt) aufgenommen. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte in weißen 96er Mikrotiterplatten (Labsystems) im Fluoroscan Ascent F1 Luminometer der Firma Labsystems. Hierzu wurden je Well 100 µl Reaktionsgemisch, bestehend aus 99 µl Renilla Luciferase Assay Puffer und 1 µl Renilla Luciferase Substrat, pipettiert und mit 10 µl Rohextrakt gemischt. Die anschließende Lumineszenz-Messung erfolgte über einen Zeitraum von 10 Sekunden. Die einzelnen Proben wurden immer nacheinander zügig zusammenpippetiert und sofort gemessen, da sonst schon nach kurzer Wartezeit erhebliche Unterschiede in den Doppelbestimmungen beobachtet werden konnten bzw. ein starker Abfall in der Aktivität zu verzeichnen war. Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU = relative light units) wurden auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen und die Ergebnisse als RLU pro µg Protein dargestellt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Rohextrakte erfolgte in einer Doppelbestimmung nach Bradford (Abschnitt 2.6.2).

2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde eine modifizierte Methode nach Laemmli (1970) genutzt. Es wurde die XCell SureLockTM Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen verwendet. Dabei kamen 8 %ige, 10 %ige oder 4-20 %ige SDS-Gele der Firma

Pierce zum Einsatz. Die Proben wurden mit 3x SDS-Ladepuffer (30 % Glycerin; 6 % SDS; 188 mM Tris/HCl pH 6,8; 15 % β-Mercaptoethanol; 0,006 % Bromphenolblau) versetzt und 10 - 15 min bei 95 °C denaturiert. I. d. R. wurden 40 - 60 µg Gesamtprotein der Rohextraktproben eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V für 45 min - 1 h, wobei HEPES-Laufpuffer (100 mM Tris; 100 mM HEPES; 1 % (w/v) SDS) verwendet wurde. Als Proteingrößenstandard diente der PageRuler (prestained) der Firma Fermentas.

2.6.5 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mittels des Tankblot-Verfahrens (Towbin *et al*., 1979) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran, Millipore) transferiert. Zur Aktivierung wurde die Membran zuvor kurz in Methanol inkubiert. Für den Proteintransfer, der über Nacht bei 10 V oder für 90 min bei 40 V erfolgte, wurde das „XCell Blot Module“ von Invitrogen verwendet. Zur Absättigung potentieller unspezifischer Bindestellen wurde die PVDF-Membran für 1 h bei RT in 5 %iger Magermilchpulver-TBST-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20; 5 % Magermilchpulver) blockiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in TBST-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) unter leichtem Schütteln bei RT. Die Membran wurde dreimal für 10 min bei RT mit TBST-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls in TBST verdünnt war, für 1 h bei RT. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran für jeweils 5 - 10 min wurde die Peroxidase unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates „SuperSignal® West Dura“ (Pierce) nach Herstellerprotokoll mittels des LAS1000 detektiert.

Primärantikörper: (1-7), Anti-HA; Monoklonal, Ratte; 1 : 2000 (Roche)
Sekundärantikörper: (2-11), Anti-Ratte, Peroxidase konjugiert; Ziege; 1 : 12000 (Pierce)

2.6.6 Gelretardierung (EMSA)

Mit Hilfe von Gelretardierungsanalysen sollte eine Interaktion von Efg1 mit *SAP2*-Promotor-Regionen untersucht werden. Die mittels PCR amplifizierten Promotor-Sequenzen wurden mit γ-[32P]-ATP durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv markiert. Diese katalysiert den Transfer der terminalen Phosphatgruppe von ATP auf 5´-OH-Enden von Nukleinsäuren. In einem Gesamtansatz von 50 µl wurden ca. 200 fmol DNA mit 4,5 U PNK (New England Biolabs, Schwalbach) und 1,68 pmol γ-[32P]-ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia, Freiburg) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unter Verwendung von MobiSpin S-200- Säulen der Firma MoBi Tec wurde die markierte DNA nach Herstellerangaben aufgereinigt, um ADP und nicht umgesetztes ATP zu entfernen. Es wurden Ansätze in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammenpipettiert, die 2 µl 10x Bindungspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,6; 500 mM KCl; 100 mM MgCl2; 10 mM EDTA; 50 % Glycerin), 5 µl radioaktiv markierte DNA (ca. 20 fmol), 1 µl Poly(dI-dC) (1 mg/ml), 1 µl 20 mM DTT und verschiedene Rohextrakt-Mengen aus dem *C.*

albicans Wildtyp-Stamm (CAI4) bzw. dem *efg1*-Mutanten-Stamm (HLC67) enthielten. Die Proben wurden für 20 min bei RT inkubiert und schließlich mit 2 µl Ladepuffer (0,1 % (w/v) Xylencyanol-Lösung in dH_2O) versetzt. Danach erfolgte die Auftrennung in einem 5 %igen, nativen Polyacrylamidgel (13,3 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid; 150 µl 20 % APS; 75 µl TEMED; 2,5 ml 10x TBE/ mit dH_2O ad 50 ml). Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE (89 mM Tris-Base; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA/ pH 8,3) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160 Volt für 2,5 bis 3,5 h. Anschließend wurde das Gel, welches auf 3MM-Whatman Papier platziert wurde, für 90 min bis 2 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Nachdem das getrocknete Gel für 2 - 7 Tage in einer Filmkassette bei -70 °C inkubiert wurde, erfolgte die Detektion mittels Autoradiographie.

2.6.7 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Für eine Chromatinimmunpräzipitation unter Hefewachstumsbedingungen wurde je Stamm eine Hauptkultur in 50 ml YPD auf eine OD_{600} = 0,2 angeimpft und bis zu einer OD_{600} = 1 bei 30 °C angezogen. Für Experimente unter Hypheninduktionsbedingungen wurden die Zellen der 5 ml YPD-Übernachtkulturen zunächst mit sterilem Wasser gewaschen und in 5 ml YP aufgenommen. Anschließend wurden Hauptkulturen in einem Gesamtvolumen von 250 ml YP-Medium inklusive 10 % Pferdeserum auf eine OD_{600} = 0,2 inokuliert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das verwendete YP-Medium war dabei zuvor auf 37 °C vortemperiert worden. Im nächsten Schritt erfolgte die Quervernetzung von Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen durch die Zugabe von frisch angesetztem 30 %igen Formaldehyd zu den kurz auf Eis gestellten Kulturen bis zu einer Endkonzentration von 1 % (Hefewachstum: 1,8 ml 30 %iges Formaldehyd; Hypeninduktion: 8,7 ml 30 %iges Formaldehyd). Im Anschluss wurden die Zellen bei etwa 18 °C für 30 min leicht geschüttelt. Die Quervernetzungs-Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 M Glycin bis zu einer Endkonzentration von 125 mM und 5 min Schütteln gestoppt. Die Zellen wurden geerntet (5 min, 3500 Upm) und zweimal mit jeweils 30 ml eiskaltem TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl) gewaschen, um Formaldehydreste zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 1 ml TBS resuspendiert und in ein 2 ml Cryoröhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation (5min, 3500 Upm) wurde der Überstand entfernt und die Zellen über Nacht bei -70 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden 500 µl Lysispuffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % Na-Deoxycholate; Proteinaseinhibitor Cocktail, Complete Mini EDTA-free/ Roche) und ein Volumen Glasperlen (Ø 0,45 mm) zugegeben. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss bei 4 °C mit Hilfe des FastPrep-24-Geräts (MP Biomedicals) mit 14 - 16 Zyklen für jeweils 40 sec bei 6,5 m/sec, wobei die Proben nach jedem zweiten Zyklus für 5 min auf Eis gestellt wurden. Der 100 %ige Zellaufschluss wurde mikroskopisch überprüft. Darauf wurde die Unterseite des 2 ml Cryoröhrchens mit einer erhitzten Kanüle (26G, Terumo) durchstochen und das Röhrchen anschließend mit gelockertem Deckel auf ein passendes Auffanggefäß gesetzt (z. B. 14 ml Greiner). Durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 1000 Upm (4 °C) wurde das Lysat im Auffangröhrchen gesammelt, wobei lediglich die Glasperlen im Urspungsgefäß zurückblieben. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt

und bei 13000 Upm für 10 min zentrifugiert (4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches das zu diesem Zeitpunkt nicht lösliche, quervernetzte Chromatin enthielt, anschließend in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Zur Fragmentierung des Chromatins wurde die Probe in einem Becher mit Eiswasser fixiert und insgesamt 17 Mal für jeweils 30 sec unter Verwendung der Microspitze mit dem Branson Sonifier B-15 sonifiziert (Einstellungen: Output controll: Stufe 4; Continous). Nach jedem Sonifikationszyklus folgte eine mindestens einminütige Pause auf Eis, während die nächste Probe beschallt wurde. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, welcher das nun lösliche Chromatin enthielt, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Davon wurden 50 µl als Input-Probe bei -20 °C eingefroren. Die restlichen 450 µl wurden auf 500 µl mit Lysispuffer aufgefüllt. Für die anschließende Immunpräzipitation wurden je Ansatz zunächst 50 µl magnetische Protein G-Beads (Dynabeads, Invitrogen) zweimal mit 500 µl Citrat-Phosphat/Tween-Puffer (24,5 mM Zitronensäure; 51,5 mM Na_2PO_4 /ph 5; 0,01 % Tween-20) gewaschen und schließlich in 200 µl desselben Puffers aufgenommen. Diesem Ansatz wurden 7 µl Anti-HA-Antikörper (monoklonal, aus Ratte, Roche) zugegeben, welcher für 50 min - 1 h bei RT (oder für 4 h bei 4 °C) unter leichtem Schwenken an das Protein G der Beads gebunden wurde. Danach wurden die magnetischen Beads dreimal mit 1 ml Citrat-Phosphat/Tween-Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Puffer wurde vollständig abgenommen und die 500 µl Sonifizier-Probe zu den Bead-Antikörper-Komplexen hinzugefügt. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Kippmischer. Am Folgetag wurden die Beads zweimal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen, danach zweimal mit 1 ml Waschpuffer I (Lysispuffer mit 500 mM NaCl), anschließend zweimal mit 1 ml Waschpuffer II (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM LiCl; 0,5 % Nonident P-40 (NP40); 0,5 % Na-Deoxycholate, 1 mM EDTA) und zum Schluss einmal mit 1 ml TE (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA). Das Waschen erfolgte bei Raumtemperatur, jedoch wurden die Puffer eisgekühlt verwendet. Die Proben wurden je Waschschritt etwa 3 min gemäßigt geschüttelt bis die Beads resuspendiert waren. Für den Puffer-Wechsel wurden die Proben für ca. 2 min in ein Magnet-Reck gestellt. Falls sich die Beads nicht vollständig an der magnetischen Wandseite ansammelten, wurden die Proben für 10 sec bei 2000 Upm anzentrifugiert und danach erneut in das Magnet-Reck positioniert. Um die präzipitierten Chromatin-Fragmente schließlich von den Antikörpern zu lösen, wurden die Beads in 150 µl Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 1 % SDS) aufgenommen und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach einer anschließenden kurzen Zentrifugation (15 sec, 10000 Upm) wurden die Proben in das Magnet-Reck gestellt und der Überstand in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Die Beads wurden erneut in Elutionspuffer (100 µl) resuspendiert, für 5 min bei 65 °C inkubiert und der Ansatz kurz zentrifugiert. Die beiden Überstände, welche das immunpräzipitierte Chromatin enthielten, wurden vereinigt und zum Aufheben der DNA-Protein-Quervernetzungen bei 65 °C über Nacht im Heizblock inkubiert. Die 50 µl Input-Proben, welche über Nacht eingefroren worden waren, wurden mit 200 µl Elutionspuffer gemischt und die Ansätze ebenfalls bei 65 °C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 250 µl TE, 2,5 µl Glykogen (20 mg/ml; Roche), 15 µl 10 %igem SDS und 7,5 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml; Roche) versetzt und die Proteine für 2 - 3 h bei 37 °C verdaut. Die immunpräzipitierte DNA wurde anschließend zweimal mit jeweils 400 µl

Phenol-Chloroform und einmal mit 400 µl Chloroform extrahiert. Die Proben wurden mit 16 µl 5 M NaCl und 1 ml abs. EtOH gemischt und ÜN bei -20 °C gefällt. Am Folgetag wurde die DNA nach einem Waschschritt mit 70 %igem EtOH (10 min, 13000 Upm) für ca. 5 - 10 min an der Luft getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen. Durch Zugabe von 2,5 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml in Wasser, Qiagen) wurde die RNA in den Proben in einer einstündigen Inkubation bei 37 °C entfernt. Zum Schluss wurden die Proben unter Verwendung des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen) aufgereinigt, wobei der Waschschritt mit PE-Puffer 2 - 3 Mal erfolgte und die Elution zum Schluss mit 2 Mal 40 µl EB-Puffer (1:3 in dH_2O verdünnt) durchgeführt wurde. Die Proben wurden dann weiter für ChIP-chip-Experimente oder direkt für PCR-Analysen eingesetzt. Die Probenlagerung erfolgte bei -20 °C.

30 %iges Formaldehyd:
3 g Paraformaldehyd (Sigma)
0,6 ml 5 M NaOH
ad 10 ml (mit ddH_2O)
Zum Lösen wurde der Ansatz für etwa 1 h ins Wasserbad (65 °C) gestellt und gelegentlich geschüttelt. Anschließend folgte eine Abkühlung auf RT (~15 min).

QIAquick PCR Purification-Kit:
Es wurde der Bindepuffer PB **ohne** Indikator benutzt. Um Salz-Rückstände effektiver zu entfernen wurde zwei- bis dreimal mit PE-Puffer (gemischt mit abs. EtOH p. a.) gewaschen und anschließend ein neues 2 ml Auffanggefäß für den „Trocken"-Zentrifugationsschritt verwendet. Die Elution erfolgte zweimal mit jeweils 40 µl EB-Puffer-Lösung (1 Teil EB und 2 Teile dH_2O).

Für die PCR-Analysen wurden jeweils 2 µl der Immunpräzipitat (IP)- und der verdünnten Input-DNA-Probe (1 : 50) eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare (ChIP 1 bis 17, ACT1p) können Tab. 2.4 entnommen werden. Die Amplifikationen (PCR-Produkte: ca. 240 - 350 bp) erfolgten nach folgendem PCR-Programm:

- 2 min 95°C
- 30 sec 95 °C
- 30 sec 52°C
- 45 sec 68°C

} x 27

2.6.8 ChIP-chip

Die ChIP-chip-Methode ist eine Kombination aus der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) und einem DNA-Microarray (chip). Sie ermöglicht eine genomweite *in vivo* Identifizierung von DNA-Binderegionen des Proteins von Interesse. In dieser Arbeit wurden die Bindestellen des Transkriptionsfaktors Efg1 genomweit unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen in *C. albicans* untersucht. Für die Chromatinimmunpräzipitation wurde der Stamm HLCEEFG1

benutzt, welcher HA-Epitop markiertes Efg1 synthetisiert. Als Kontrolle diente entweder der Stamm DSC11 oder SC5314, welche beide keine Epitop-Markierung am *EFG1* aufweisen. Insgesamt wurden drei unabhängige biologische Replikate mittels ChIP-chip analysiert. Die ChIP-Proben wurden unter Verwendung eines Anti-HA-Antikörpers wie im obigen Abschnitt 2.6.7 beschrieben gewonnen. Für die ChIP-chip-Experimente wurden lediglich die Immunpräzipitat (IP)-Proben (und nicht die Input-Proben) verwendet. Nach der Chromatinimmunpräzipitation und dem Aufreinigungsschritt mit dem QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) musste die immunpräzipitierte DNA zunächst aufgrund der zu geringen DNA-Ausgangsmenge für die anstehende Cy3- bzw. Cy5-Markierung und Array-Hybridisierung vervielfältigt werden. Dazu wurde das GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA)-Kit (WGA2) von Sigma verwendet. Zur Volumeneinengung wurden die gesamten ChIP-Poben (~ 80 µl) in einem PCR-Reaktionsgefäß lyophylisiert und in 10 µl ddH_2O aufgenommen. Danach wurden die Proben mit 1 µl 10x Fragmentierungspuffer versetzt. Der folgende nach Herstellerprotokoll angegebene Inkubationsschritt bei 95 °C zur Fragmentierung der DNA wurde jedoch ausgelassen, da die DNA durch Sonifizierung fragmentiert worden war. Alle folgenden Schritte (Library Preparation, Amplification) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Abschließend wurden die amplifizierten Proben mit Hilfe des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen) aufgereinigt und in einem Gesamtvolumen von 70 µl (2 x 35 µl) EB-Puffer (1:3 in dH_2O verdünnt) eluiert. Die Konzentration der DNA wurde unter Verwendung des NanoDrop Spektrophotometers (Thermo Scientific) bestimmt. Falls die DNA-Menge noch nicht ausreichend für die Microarray-Hybridisierung war, wurde zusätzlich nach dem WGA2-Kit noch das GenomePlex WGA Reamplification-Kit (WGA3) von Sigma eingesetzt (für alle Hefe-ChIP-Proben). Dazu wurden 60 ng der mittels WGA2-Kit amplifizierten DNA für die Reamplifikation als Template eingesetzt und alle Schritte nach Herstellerprotokoll (Reamplification Procedure A) durchgeführt. Die Proben wurden zum Schluss aufgereinigt (QIAquick PCR Purification-Kit, Qiagen) und 5 µl gelelektrophoretisch (1,5 % Agarosegel) analysiert, wobei ein DNA-Schmier von etwa 200 bp bis 1000 bp mit einer durchschnittlichen Fragment-Größe von ca. 500 bp feststellbar war. Anschließend wurden mindestens 1,8 µg je ChIP-Probe (WGA behandelt) an imaGenes (Berlin) geschickt, wo die weitere Farbstoff-Markierung der Proben (je 1 µg) und die Microarray-Hybridiesierung erfolgten. Die Anreicherungs-ChIP-Probe aus dem Stamm HLCEEFG1 (HA-Epitop markiertes *EFG1*) wurde mit dem Fluorochrom Cy5 markiert, wobei die Kontroll-ChIP-Probe aus dem Stamm DSC11/SC5314 mit Cy3 fluoreszenzmarkiert wurde. Beide Proben wurden vereinigt und auf einem *Candida albicans* ChIP-DNA-Array (*Whole Genome Tiling Array*) hybridisiert. Nach mehreren Waschschritten folgten der Array-Scan und die weitere Auswertung der Signale mit Hilfe der NimbleScan Software. Es wurde das Verhältnis der Fluoreszenzsignale von Anreichrungsprobe (Cy5; HLCEEFG1) zu Kotrollprobe (Cy3; DSC11/SC5314) für jede Oligonukleotidsequenz-Position auf dem Array ermittelt und als $\log_2$-ratio ausgedrückt. Von jedem $\log_2$-ratio-Wert wurde dann der sogenannte Bi-Weight-Mittelwert aus allen $\log_2$-ratio-Werten subtrahiert (scaling) um den Bias der beiden Farbstoffe auszugleichen. Aus dieser Korrektur ergaben sich die sog. scaled $\log_2$-ratio-Werte. Über die Chromosomen wurden 500 bp Fenster gelegt und innerhalb dieser die Efg1-Binderegionen (Peaks) durch einen speziellen Algorithmus (Roche NimbleGen) ermittelt.

Diese gelten als signifikant, wenn vier oder mehr Signale über einer definierten Schwelle (cutoff value) liegen. Der Grad der Signifikanz der detektierten Peaks wurde über den FDR (false discovery rate)-Wert ermittelt und ist farblich kodiert. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für eine tatsächliche Binderegion umso größer, je kleiner der FDR-Wert ist:

FDR ≤ 0,05 (rot, höchste Wahrscheinlichkeit für eine Bindestelle)
FDR ≤ 0,1 (orange)
FDR = 0,1 bis 0,2 (gelb)
FDR > 0.2 (grau, niedrigste Wahrscheinlichkeit für eine Bindestelle)

Eine Visualisierung der scaled log_2-ratio-Werte (GFF.-Dateien) und der signifikanten Binde-Peaks (Finding Peak-Dateien) erfolgte mit dem Programm SignalMap (Version 1.9).

Die benutzten 385K *C. albicans*-Genom-Tiling-Arrays mit insgesamt 381308 Oligonukleotidsequenzen basierend auf dem Assembly 21 wurden von Roche NimbleGen synthetisiert und bezogen (090722_CA_JM_ChIP, OID 23054). Für das Array-Design wurden isothermale Oligonukleotid-Sonden (50 - 75 bp) verwendet. Die Sequenzlänge betrug im Mittel (Median) 58 Nukleotide und der GC-Gehalt je Sonde lag bei 36,5 %. Die Tm für alle Sonden war 76 °C und der Abstand zwischen ihnen betrug im Mittel 36 Nukleotide, wodurch sich eine Überlappung der meisten Sonden mit den benachbarten Oligonukleotidsequenzen ergab.

3 Ergebnisse

3.1 Der Regulator Efg1 in *C. albicans*

Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist ein zentraler Regulator der Morphogenese in *C. albicans* (Stoldt *et al.,* 1997). Dabei kommt ihm eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Hyphenwachstums zu, welches bedeutend für die Virulenz des humanpathogenen Pilzes ist. Die *efg1*-Mutante ist unter nahezu allen Wachstumsbedingungen nicht mehr fähig Hyphen zu bilden und ist avirulent im Mausmodell (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.,* 1997). Über die molekularen Mechanismen der Efg1-Regulation ist nur wenig bekannt. Es wird angenommen, dass das *EFG1*-Gen einer negativen Autoregulation unterliegt. Zum einen wurde mittels Northern-Analyse gezeigt, dass der *EFG1*-Transkriptspiegel kurz nach Hypheninduktion signifikant abnimmt. Unterbleibt dieser *EFG1*-Transkiptabfall können die Zellen keine echten Hyphen mehr ausbilden. Zum anderen führte die *EFG1*-Überexpression zu einer Efg1-abhängigen Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität in Reporterstudien (Tebarth *et al.,* 2003). Darüber hinaus konnte durch Gelretardierungsexperimente die Bindung von Efg1 an ein 408 bp-*EFG1*-Promotorfragment nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer DNA-Footprint-Untersuchung wurde eine Region, welche das Palindrom TATGCATA aufweist, als Efg1-Bindestelle innerhalb des 408 bp-*EFG1*-Promotorfragments identifiziert. Dieses könnte für die Regulation des *EFG1*-Promotors von Bedeutung sein. Das Schema in Abb. 3.1 zeigt den *EFG1*-ORF und das nächste stromaufwärts gelegene Gen tG(GCC)1 (tRNA-Gly), wobei die intergene Region fast 10 kb beträgt und damit ungewöhnlich lang ist.

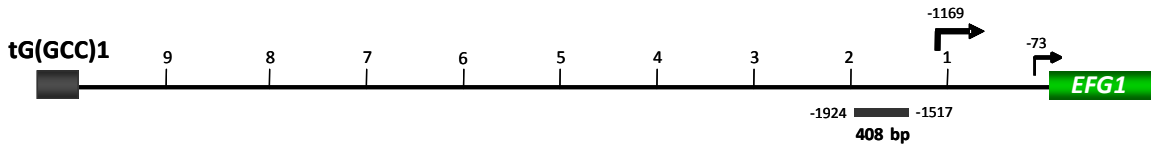


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Stromaufwärtsregion von *EFG1.* Die intergene Region zwischen dem *EFG1*-ORF und dem nächsten Stromaufwärts-Gen tG(GCC)1 (tRNA-Gly) beträgt fast 10 kb. Das tG(GCC)1-Gen weist eine zu *EFG1* entgegengesetzte Orientierung auf. Dargestellt ist die Position der 408 bp-Promotorregion, an welche Efg1 *in vitro* gebunden hat. Zudem sind die beiden *EFG1*-Transkriptionsstartpunkte (Haupttranskript bei -1169) durch Pfeile markiert, wobei deren Position in bp relativ zum *EFG1*-ATG angegeben ist.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Regulation des *EFG1*-Promotors unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen untersucht. Durch Deletionsanalysen sollte dabei der *EFG1*-Promotorbereich eingegrenzt werden, der wichtig für die Herabsetzung der Promotoraktivität ist. In diesem Zusammenhang sollte insbesondere die Bedeutung der palindromischen TATGCATA-Sequenz, an welche Efg1 *in vitro* gebunden hat, für die *EFG1*-Promotorregulation analysiert werden.

3.2 Relativer Transkriptspiegel des *EFG1*-Gens während der Hypheninduktion

Tebarth *et al.* (2003) konnten mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse zeigen, dass das *EFG1*-Transkript während der Hypheninduktion herabreguliert wird. Findet dieser *EFG1*-mRNA-Abfall nicht statt, wie es für die *sin3*-Mutante gezeigt wurde, sind die Zellen nicht in der Lage echte Hyphen auszubilden. In dieser Arbeit sollte der relative *EFG1*-Transkriptspiegel mittels der sensitiveren qPCR quantifiziert werden. Dazu wurde der Wildtyp-Stamm CAI4 für 10 Minuten in YP-Medium bei 37 °C vorinkubiert, worauf die Hypheninduktion durch die Zugabe von 10 % Serum erfolgte. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten - 1 Minute vor Serumzugabe, 10, 20, 60 und 90 Minuten nach Induktion - geerntet. Nach ungefähr 30 Minuten war unter dem Mikroskop eine beginnende Ausbildung von Keimschläuchen zu beobachten und 90 Minuten nach Hypheninduktion hatten ca. 90 - 95 % der Zellen Hyphen geformt (Daten nicht gezeigt). Für die Ermittlung des relativen *EFG1*-Transkriptspiegels wurde die Gesamt-RNA der einzelnen Zeitproben isoliert und mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert, wobei das Aktin-Transkript jeweils als interne Referenz diente.

In Abb. 3.2 ist der *EFG1*-mRNA-Spiegel zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Hypheninduktion dargestellt, wobei Messungen von zwei verschiedenen RNA-Präparationen (biologische Replikate) durchgeführt wurden. 10 Minuten nach Serumzugabe ist eine etwa sechsfache Erniedrigung des *EFG1*-Transkriptspiegels im Vergleich zum Zeitpunkt kurz vor Serumzugabe (-1 min) zu beobachten. Der *EFG1*-Transkriptspiegel-Tiefstpunkt ist nach etwa 20 Minuten zu verzeichnen (ca. neunfach erniedrigt) und steigt dann langsam und stetig wieder an, so dass dieser nach 90 Minuten nur noch eine etwa dreifache Erniedrigung in Relation zum Zeitpunkt kurz vor Serum-Induktion aufweist.

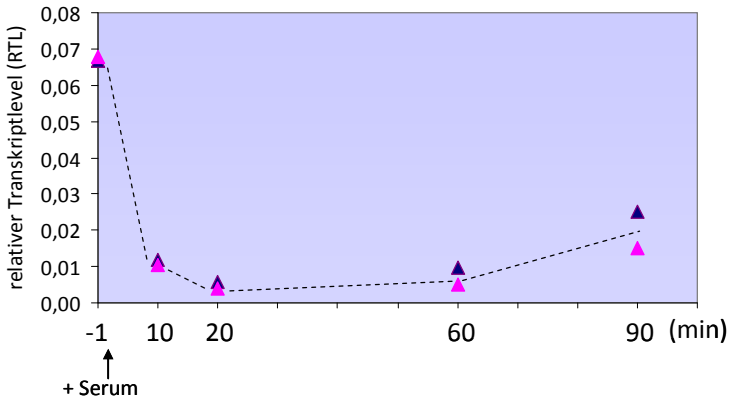


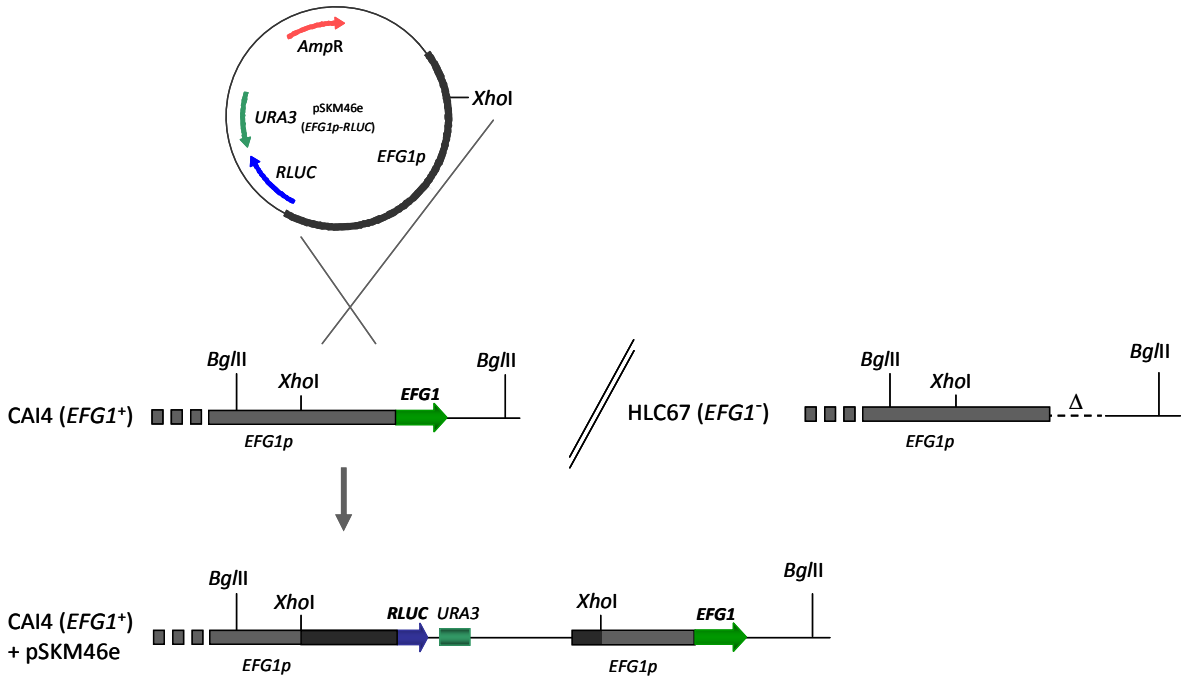
Abb. 3.2: Relativer *EFG1*-Transkriptspiegel während der Hypheninduktion. Der Wildtyp-Stamm CAI4 (OD_{600} = 0,2) wurde für 10 Minuten in YP-Medium bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Hypheninduktion durch Zugabe von 10 % Serum zum Kulturansatz. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Beim Zeitpunkt -1 min erfolgte die Zellernte kurz vor Serumzugabe. Die relativen *EFG1*-Transkriptspiegel (RTL) wurden mittels qPCR mit *ACT1* als Referenzgen ermittelt. Die Dreiecke repräsentieren die relativen *EFG1*-Transkriptlevel von zwei unabhängigen RNA-Präparationen (biologische Replikate).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die *EFG1*-Transkription offensichtlich sofort nach Hypheninduktion zum Stillstand kommt und der Großteil der vorhandenen *EFG1*-mRNA ungewöhnlich schnell (Halbwertszeit < 5 min) abgebaut wird.

3.3 *EFG1*-Promotoraktivität in der Hefewuchsform und unter Hyphen-induktionsbedingungen

Mit Hilfe des für die Luziferase kodierenden Reportergens *RLUC* wurde die *EFG1*-Promotoraktivität unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen untersucht. Es sollte verifiziert werden, dass Efg1 für die Repression des eigenen Promotors von Bedeutung ist. Für die Messungen wurden Transformanten aus einer Vorarbeit von Eva Szafranski (2007) verwendet. Diese entstanden durch die Integration des *EFG1p-RLUC*-Konstrukts (Plasmid pSKM46e) in den genomischen *EFG1*-Promotorlokus (in eines der beiden Allele). Dazu wurde das Plasmid pSKM46e innerhalb der plasmideigenen *EFG1*-Promotorsequenz (ca. 3,7 kb) über *Xho*I linearisiert und in den Wildtyp-Stammhintergrund CAI4 und den *efg1*-Deletionsstamm HLC67 transformiert (resultierende Stämme: (wt) ES2 1/2/3 bzw. (*efg1*) ES6 1/2/3). Als Konsequenz der homologen Rekombination steht der *RLUC*-Reporter - im Wildtyp und in der *efg1*-Mutante - unter der Kontrolle der vollständigen *EFG1*-Stromaufwärtsregion. Im Fall des Wildtyp-Stamms wurde dadurch der *EFG1*-ORF durch den *RLUC*-ORF ersetzt, im *efg1*-Mutanten-Stammhintergrund sind hingegen beide *EFG1*-ORFs deletiert (Integrationsschema s. Abb. 3.3 A).
Die Transformanten (ES2, ES6) wurden zum einen in der Hefeform in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 1 wachsen gelassen, zum anderen wurden sie unter Hyphenwachstumsbedingungen in YP-Medium mit 10 % Serum bei 37 °C für 1,5 Stunden angezogen. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Luziferase-Aktivitäten der Rohextrakte bezogen auf den Gesamtproteingehalt bestimmt.
Ein exemplarisches Messergebnis ist in Abb. 3.3 (B) dargestellt. Während in der Hefeform zwischen dem Wildtyp und der *efg1*-Mutante kein Unterschied in den Luziferase-Aktivitäten besteht, ist unter Hypheninduktionsbedingungen eine etwa vierfach erniedrigte Reporter-Aktivität im Wildtyp in Relation zur *efg1*-Mutante zu beobachten. Um einen möglichen Zelldichte-Einfluss auf die *EFG1*-Promotorregulation unter Hefewachstumsbedingungen zu überprüfen, wurden die Kulturen bei unterschiedlichen optischen Dichten (logarithmische Phase OD_{600} = 0,5 - 0,6; stationäre Phase OD_{600} = 2,0 und 3,5) geerntet. Die ermittelten Luziferase-Aktivitäten im Wildtyp und in der *efg1*-Mutante wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den Reporter-Aktivitäten bei einer OD_{600} von 1 auf (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine kürzere Hyphen-Induktionszeit (35 Minuten) zu einem geringeren Unterschied in der Luziferase-Aktivität zwischen dem Wildtyp (etwa 2,5-fach erniedrigt) und der *efg1*-Mutante führt (Daten nicht gezeigt).

(A)



(B)

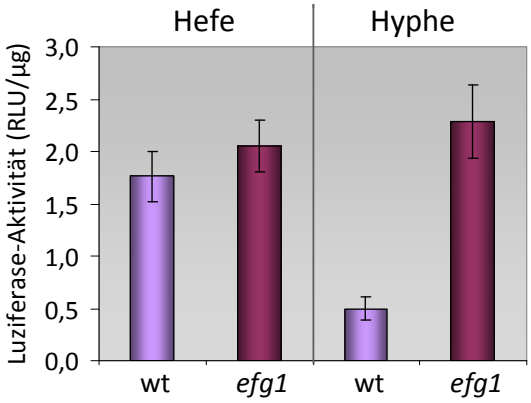


Abb. 3.3: *EFG1*-Promotoraktivität unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen. **(A)** Schematische Darstellung zur Integration des Plasmids pSKM46e (*EFG1p-RLUC*). Dieses wurde über *Xho*I linearisiert und in den endogenen *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert. **(B)** Jeweils drei unabhängige Transformanten des Wildtyps (ES2 1/2/3) und der *efg1*-Mutante (ES6 1/2/3) wurden unter Hefewachstumsbedingungen (YPD, 30 °C) und unter Hypheninduktionsbedingungen (YP + 10 % Serum, 37 °C) angezogen. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} = 1 (Hefe) bzw. 1,5 Stunden nach Hypheninduktion geerntet. Dargestellt sind die gemittelten Luziferase-Aktivitäten der Zellextrakte (RLU (relative light units)/ µg Protein) und die Standardabweichungen.

Es kann zusammengefasst werden, dass die *EFG1*-Promotoraktivität in der Hefewuchsform nicht von Efg1 abhängt, da diese in der *efg1*-Mutante einen vergleichbaren Wert aufweist. Jedoch wird Efg1 für die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität während der Hypheninduktion benötigt, da die *efg1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine erniedrigte Luziferase-Aktivität aufweist.

3.4 Deletionsanalysen zur Untersuchung der *EFG1*-Promotorregulation

In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch *in vitro* Gelretardierungsexperimente gezeigt werden, dass Efg1 an eine 408 bp-*EFG1*-Promotorsequenz bindet, welche etwa 755 bp stromaufwärts vom *EFG1*-Haupttranskriptionsstartpunkt liegt bzw. -1924 bp vom *EFG1*-Translationsstart entfernt ist (Bußmann, 2006; Kurtz, 2010). In Abb. 3.4 (A) ist die Position des 408 bp-Promotorfragments und des benachbarten ebenfalls untersuchten 313 bp-*EFG1*-Promotorfragments schematisch dargestellt, für das keine Efg1-Bindung nachgewiesen werden konnte (Doedt, 2000). Darüber hinaus wurde in einer *in vitro* Footprint-Analyse eine 13 bp-Region innerhalb des 408 bp-Fragments identifiziert (Abb. 3.4 (B); grau unterlegt), welche durch die Bindung von GST-Efg1 vor einem DNase I-Verdau geschützt wurde (Bußmann, 2006). Interessanterweise enthält diese 13 bp-Sequenz (5´-TATGCATATATGC-3´) das Palindrom TATGCATA, das als Dreifach-Tandemwiederholung auftritt. Diese Sequenz

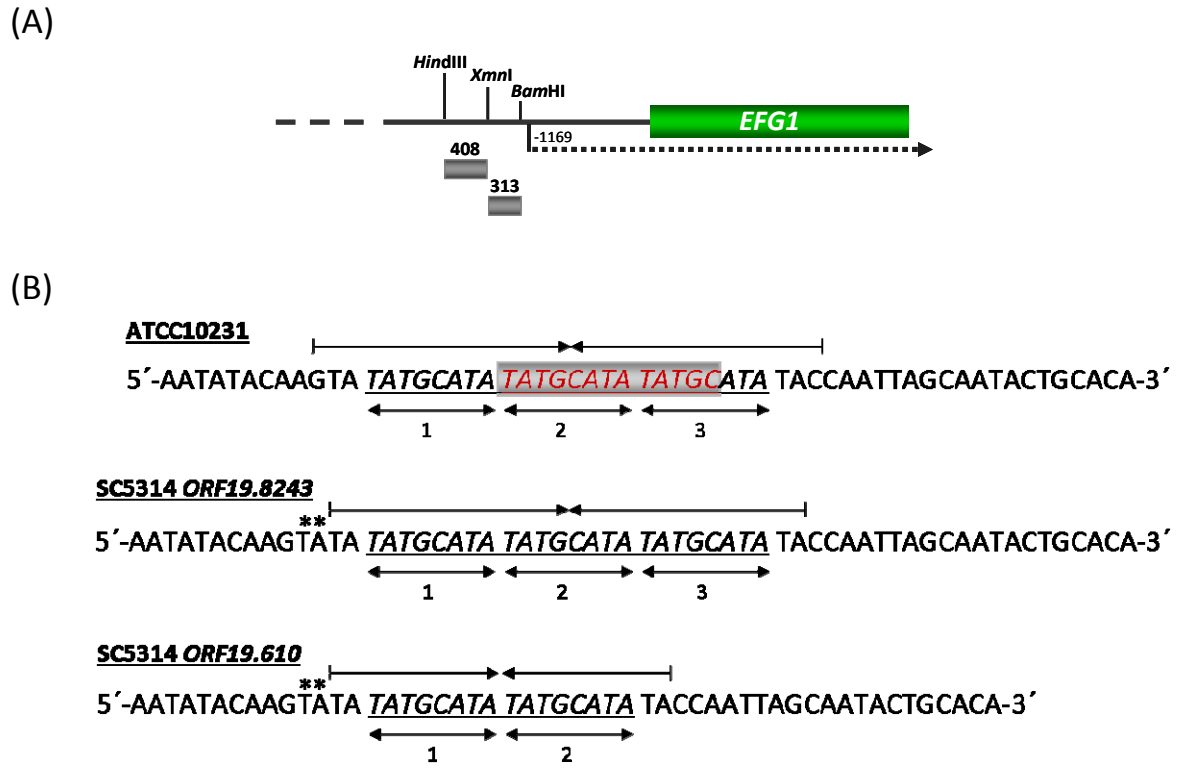


Abb. 3.4: Efg1-Binderegion im *EFG1*-Promotor. (A) Schema des *EFG1*-Lokus. Dargestellt sind der *EFG1-ORF* (grüner Kasten) und der *EFG1*-Hauptranskriptstart (-1169 bp relativ zum *EFG1*-ORF). Innerhalb des *EFG1*-Promotors ist das 408 bp- und das 313 bp-Fragment, welche in früheren Studien mittels Gelretardierung auf eine Efg1-Bindung hin analysiert wurden, jeweils als grauer Kasten hervorgehoben. **(B)** Sequenzausschnitt des 408 bp-*EFG1*-Promotorfragments. Die in einer Footprint-Analyse vor DNase I-Verdau geschützte 13 bp-Efg1-Binderegion ist in rot hervorgehoben und grau unterlegt. Die für die Analyse verwendete *EFG1*-Promotorsequenz basiert auf der Genomsequenz des *C. albicans* Stamms ATCC10231. Die identifizierte Efg1-Bindestelle enthält das Palindrom TATGCATA (EGR-Box), welches drei direkte Wiederholungen in diesem Allel aufweist. Die Allele (*ORF19.8234* und *ORF19.610*) im Stamm SC5314 zeigen Sequenzunterschiede zum Stamm ATCC10231 auf (gekennzeichnet durch Sternchen) und enthalten ebenfalls drei bzw. nur zwei EGR-Box-Wiederholungen. Palindromische und invertierte Sequenz-Wiederholungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

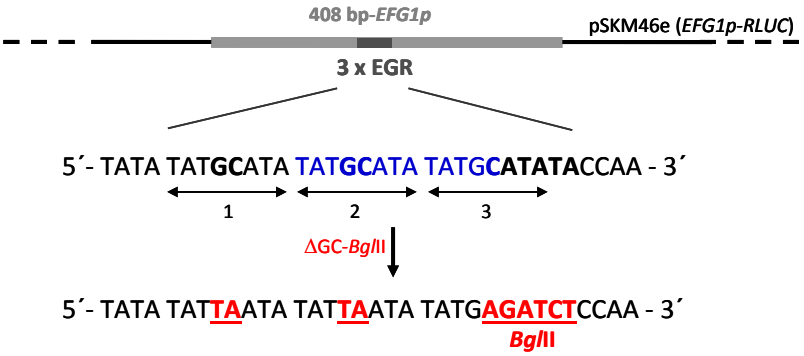
wurde als Efg1-Erkennungsmotiv angenommen und erhielt die Bezeichnung EGR (Efg1 recognition)-Box. Das für die DNA-Footprint-Analyse verwendete 408 bp-*EFG1*-Promotorfragment basiert auf der Sequenz des *C. albicans*-Stamms ATCC10231, von welchem *EFG1* erstmalig charakterisiert worden war (Stoldt *et al.,* 1997). Das für die *EFG1p*-Luziferase-Messungen und späteren *EFG1p*-Deletionsanalysen verwendete Integrations-Plasmid pSKM46e (*EFG1p-RLUC*) enthält hingegen die Promotorsequenz des *EFG1*-Allels *ORF19.8243* aus dem Stamm SC5314. Die ATCC10231- und *ORF19.8243*-Sequenzen sind jedoch sehr ähnlich und enthalten jeweils drei TATGCATA-Wiederholungen innerhalb der 408 bp-Region, während das *ORF19.610*-Allel im Stamm SC5314 lediglich zwei TATGCATA-Palindrome aufweist (Abb. 3.4 B). Somit sind die Promotoren der beiden *EFG1*-Allele im Stamm SC5314 unterschiedlich. Die Bindung des rekombinanten GST-Efg1 im Footprint-Experiment erfolgte an die vollständige mittlere 8 bp lange EGR-Box und an die fünf nächsten Nukleotide (5´-TATGC-3´) der dritten EGR-Box, wobei diese dritte Palindrom-Wiederholung im *ORF19.610* (Stamm SC5314) nicht auftritt. In einer genomweiten transkriptomalen Kurzzeitkinetik-Studie wurden frühe Zielgene von Efg1 zu Beginn der Hypehninduktion identifiziert (Stichternoth und Ernst, 2009). Interessanterweise enthalten die meisten dieser Gene in ihrem Promotorbereich eine EGR-Sequenz (TATGCATA) und/oder das Kernmotiv (ATGCAT). Im Folgenden sollte die potentielle regulatorische Funktion der EGR-Sequenz insbesondere im Zusammenhang mit der negativen Autoregulation von *EFG1* untersucht werden.

3.4.1 Nukleotidaustausche innerhalb der EGR-Sequenzwiederholung im *EFG1*-Promotor

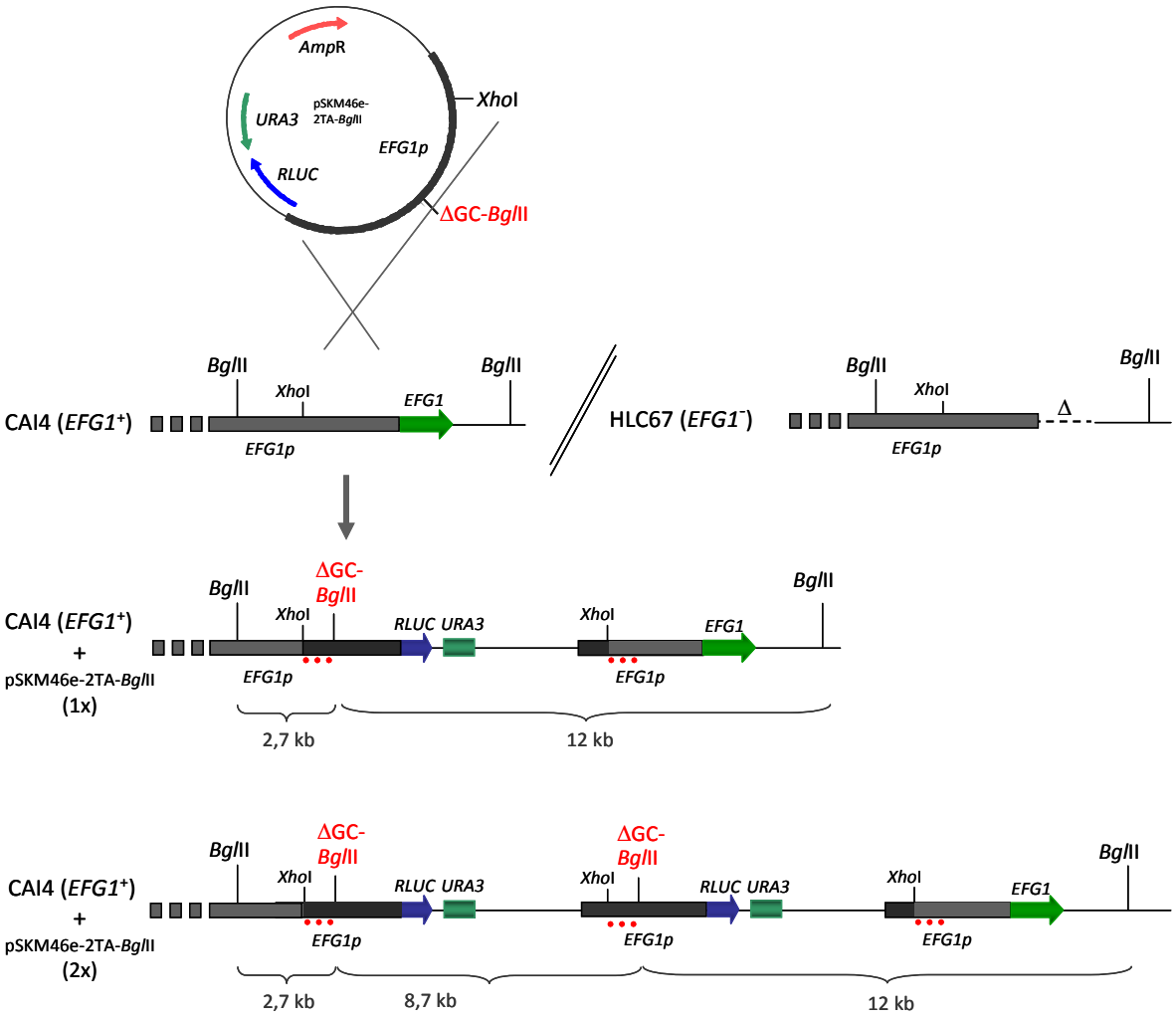
Da der GC-Gehalt im *C. albicans*-Genom mit 36,8 % relativ gering ist (Lloyd und Sharp, 1992), könnten GC-Basenpaare eine regulatorische Funktion in Promotorregionen haben. Um zu untersuchen, ob die drei palindromischen EGR-Box-Sequenzen einen Einfluss auf die Represssion des *EFG1*-Promotors unter Hyphenwachstumsbedingungen haben, wurden die zentralen GC-Sequenzen innerhalb der ersten beiden Palindrome durch TA-Nukleotidpaare ausgetauscht und das dritte EGR-Motiv wurde durch eine *Bgl*II-Schnittstelle modifiziert, wobei aus der GC-Abfolge ein GA resultierte. Durch die *Bgl*II-Schnittstelle sollte die Verifizierung der Mutagenese-PCR erleichtert und eine spätere Insertion von Sequenzen ermöglicht werden. Die Mutagenese-PCR wurde an dem Plasmid pSKM46e unter Benutzung der Primer 3xR-Box EFG1p_2 AT-*Bgl*II_for und 3xR-Box EFG1p_2 AT-*Bgl*II_rev durchgeführt. Das neu generierte Plasmid erhielt den Namen pSKM46e-2TA-*Bgl*II und wurde durch eine Testrestriktion und eine anschließende Sequenzierung (Primer: Sequenz.1974-EFG1-Promotor-vor) verifiziert (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.5 A ist die eingeführte Sequenzmodifikation in einem Schema verdeutlicht. Das Plasmid pSKM46e-2TA-*Bgl*II wurde mit dem Restriktionsenzym *Xho*I innerhalb der *EFG1*-Promotorsequenz linearisiert und durch homologe Rekombination in den nativen *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert (Abb. 3.5 B). Transformanten mit einer Einfach-Integration des Plasmids an der korrekten Position im Genom wurden mittels einer Southern-Analyse ermittelt. Dazu wurde die genomische DNA der Transformanten mit dem Enzym *Bgl*II

geschnitten und mit einer zur *EFG1*-Promotorsequenz komplementären ca. 1,3 kb großen Sonde analysiert. Als Kontrolle diente die geschnittene, genomische DNA des Wildtyp-Stamms CAI4 ohne Plasmidintegration. In Abb. 3.5 C ist exemplarisch eine Southern-Blot-Analyse gezeigt.

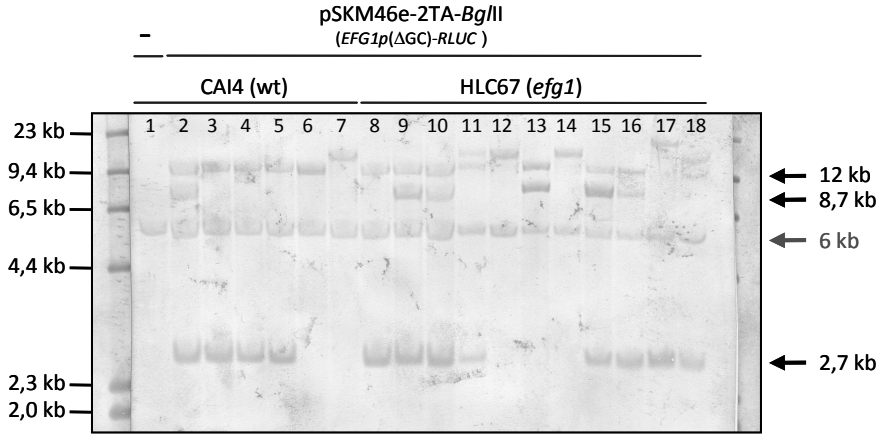
(A)



(B)



(C)



(D)

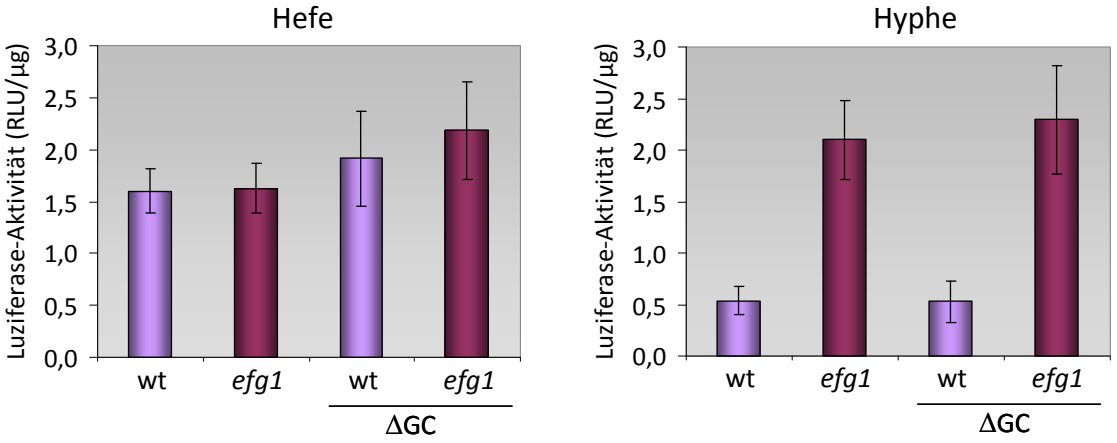


Abb. 3.5: GC-Austausch innerhalb der EGR-Motivwiederholung. (A) Schematisch dargestellt ist die mittels Mutagenese-PCR erzeugte Sequenzveränderung innerhab der drei EGR-Boxen (3-mal TATGCATA) im *EFG1*-Promotor auf dem Plasmid pSKM46e. Die GC-Sequenz der EGR-Box 1 und 2 wurde gegen ein TA ausgetauscht. In die 3. EGR-Box-Region wurde eine *Bgl*II-Schnittstelle eingebaut, wobei die Nukleotid-Anzahl beibehalten, das GC jedoch in ein GA verändert wurde. Es entstand das Plasmid pSKM46e-2TA-*Bgl*II. **(B)** Das Schema zeigt die genomische Integration (singulär oder zweifach) des Plasmids pSKM46e-2TA-*Bgl*II (*EFG1p*(ΔGC)-*RLUC*-Fusion). Dieses wurde über *Xho*I linearisiert und in den nativen *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert. **(C)** Exemplarische Darstellung einer Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der genomischen Integration des Plasmids pSKM46e-2TA-*Bgl*II. Die Restriktion der genomischen DNA der Transformanten und der Kontrolle (Stamm CAI4 ohne Plasmid-Integration; Spur 1) erfolgte mit dem Enzym *Bgl*II. Zur Detektion wurde eine ca. 1,3 kb große *EFG1p*-Sonde (s. Abb. 3.5 B; rote Punkte) verwendet, welche durch Restriktion des Plasmids pES1 mit *Xho*I und *Bgl*II erhalten wurde. Bei einer korrekten Einfach-Plasmid-Integration ergeben sich neben der 6 kb-Bande zwei zusätzliche Banden bei 2,7 kb und 12 kb (Spur 3-5, 8). Eine mehrfache Integration des Plasmids resultiert in einer zusätzlichen vierten Bande von 8,7 kb (Spur 2, 9, 10, 13, 15, 16). Das Signal bei 6 kb ist auf das zweite *EFG1*-Allel - ohne eine Plasmid-Integration - zurückzuführen. Abweichende Signal-Größen könnten in einer Fehlintegration oder aber in einer nicht vollständigen Restriktion der genomischen DNA begründet liegen (Spuren 7, 11, 12, 14, 17, 18). Als Größenstandard diente *Hin*dIII-geschnittene λ-DNA. **(D)** Jeweils drei unabhängige Transformanten mit integriertem Plasmid pSKM46e-2TA-*Bgl*II (wt-2TA-*Bgl*II; efg1-2TA-*Bgl*II) wurden unter Hefewachstumsbedingungen und unter Hypheninduktionsbedingungen wie in Abb. 3.3 angezogen und die Luziferase-Aktivitäten ermittelt. Als Referenz

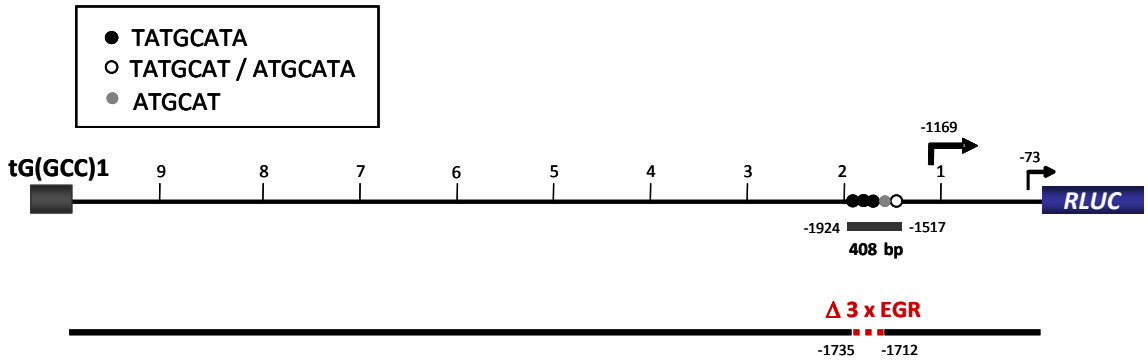
dienten die Wildtyp- (ES2) und die *efg1*-Transformanten (ES6) mit genomisch integriertem Plasmid pSKM46e (*EFG1p-RLUC*) ohne Basenaustausch in der *EFG1*-Promotorsequenz.

Aufgrund der Integration des Plasmids in nur eines der beiden *EFG1*-Promotor-Allele war eine DNA-Bande von 6 kb bei allen Transformanten und wie erwartet auch bei der Kontroll-Probe zu verzeichnen. Im Falle einer korrekten Plasmid-Integration traten zwei zusätzliche Signale bei 2,7 kb und 12 kb auf. Die positiven Transformanten beider Stammhintergründe wurden unter Hefewachstumsbedingungen (YPD, 30 °C) und unter Hypheninduktionsbedingungen (YP + 10 % Serum, 37 °C) angezogen. Als Referenz dienten die Wildtyp- und *efg1*-Transformanten ohne einen Sequenzaustausch im *EFG1*-Promotor (ES2; ES6).
Die ermittelten Luziferase-Aktivitäten der Rohextrakte sind in Abb. 3.5 (D) dargestellt. Wie zu sehen ist, zeigen die GC-Nukleotidveränderungen innerhalb der EGR-Dreifachsequenz keinen Einfluss auf die *EFG1*-Promoraktivität unter beiden Wachstumsbedingungen im Vergleich zu den Transformanten ohne Sequenzmodifikation. Die Efg1-abhängige etwa 4-fache Erniedrigung der Promotoraktivität im Wildtyp in Relation zur *efg1*-Mutante bleibt während der Hypheninduktion auch weiterhin bestehen. Daher wird eine regulatorische Funktion der GC-Basenpaare ausgeschlossen.

3.4.2 Deletion der dreifachen EGR-Box-Wiederholung im *EFG1*-Promotor

Da die Efg1-bedingte *EFG1*-Promotorrepression unter Hypheninduktionsbedingungen trotz der GC-Austausche innerhalb der EGR-Sequenzen immer noch funktionell war, sollten die drei EGR-Boxen in ihrer Gesamtheit deletiert werden. Dazu wurde eine erneute Mutagenese-PCR an dem Plasmid pSKM46e durchgeführt (Primer: 3xR-Box *Bgl*II insert For und 3xR-Box *Bgl*II insert Rev). Das daraus resultierende Plasmid enthielt nun statt der drei EGR-Sequenzen innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion lediglich eine *Bgl*II-Schnittstelle und wurde pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II benannt. Die Verifikation erfolgte über eine Testrestriktion, gefolgt von einer Teilsequenzierung des Plasmids (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid wurde in den nativen *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert. Die korrekte und singuläre Plasmid-Integration wurde mit Hilfe

(A)



(B)

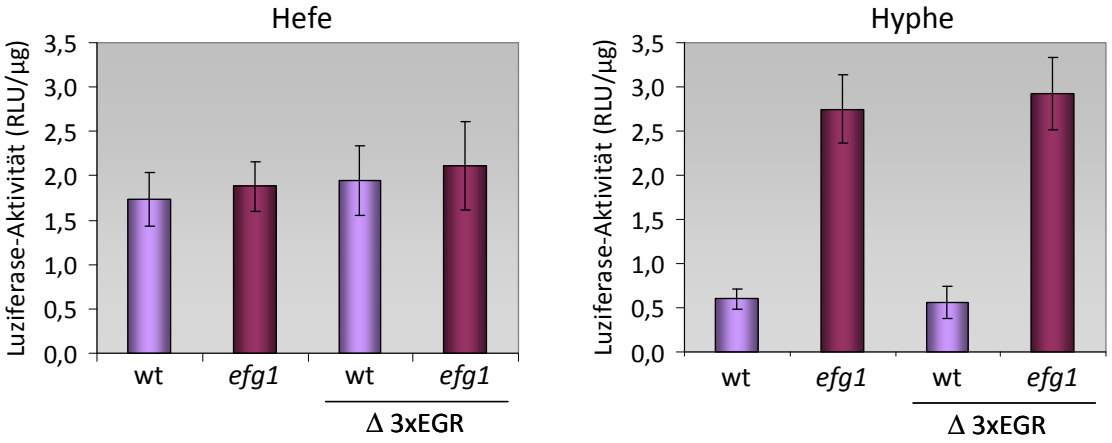


Abb. 3.6: *EFG1*-Promotoraktivität nach Deletion der drei EGR-Boxen innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen. Das Plasmid pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II (*EFG1p*(Δ3xEGR)-*RLUC*-Fusion) wurde über *Xho*I linearisiert und in den *EFG1*-Promotorlokus des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert. **(A)** Schematisch dargestellt ist die Position der 3xEGR-Deletion (3 x TATGCATA (schwarze Kreise); gepunktete rote Linie) innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion in den Transformanten (wt-Δ3xEGR und efg1-Δ3xEGR). Die Positionen sind in bp relativ zum ATG angegeben. Weitere EGR-ähnliche Boxen innerhalb der 408 bp-Region sind durch einen weißen (TATGCAT / ATGCATA) bzw. grauen Kreis (ATGCAT) markiert. Die *EFG1*-Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. **(B)** Jeweils drei unabhängige Transformanten (wt-Δ3xEGR und efg1-Δ3xEGR) wurden unter Hefewachstumsbedingungen und unter Hypheninduktionsbedingungen wie in Abb. 3.3 getestet und die Luziferase-Aktivitäten gemittelt.

einer Southern-Analyse wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben überprüft (Daten nicht gezeigt). Die ermittelten Luziferase-Aktivitäten der positiven Transformanten und der Referenz-Stämme ohne eine Deletion im *EFG1*-Promotor sind in Abb. 3.6 dargestellt. Auch nach der vollständigen Deletion der drei palindromischen EGR-Sequenzen im *EFG1*-Promotor (Abb. 3.6 A) konnten keine Unterschiede in den Luziferase-Aktivitäten im Vergleich zu den Referenz-Stämmen unter den beiden getesteten Wachstumsbedingungen festgestellt werden. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die drei EGR-Boxen innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion nicht wichtig oder nicht alleine ausreichend sind, um die Repression der *EFG1*-Promotoraktivität durch Efg1 unter Hypheninduktionsbedingungen zu bewirken.

3.4.3 Deletionen innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurde vermutet, dass ein größerer Sequenzbereich innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion für die negative *EFG1*-Promotorautoregulation notwendig sein könnte. Daher wurden basierend auf dem Plasmid ohne EGR-Motive (pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II) drei weitere Plasmide mit größeren Deletionen innerhalb der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion konstruiert.

(A)

*Hin*dIII-AGCTTTCACTACAACCTAATTAATTAAGATTGGGTTAGTTTAGTTTTTAGAAAAG

TTATTGTCTTAACTTTTGCCCAGAATTTGCATTGCATTACTCATTGTGCATCTTTTTTCTAT

TTGCTATTTCATTTTCACTTTGTTGAATTATGGTACATTGACGCCAACAATAGAAACTAAT

ATACAAGTATAAGATCTTACCAATTAGCAATACTGCACAATAACAACAATAGTTACAAAA

Δ3xEGR-*Bgl*II

GCGGTAGTGTTTTTTTCCAAATGCATTTCGTGATAAAATGGGCTTATTATGCATTCAGTCA

TACATATACATAACCCACACCATGCAATCAATACTAATTATACAAATAGCACTAAAAAGA

ATTTATCAAGTGAGTGAGAAGTAGTAGAAGG-*Xmn*I

del 1 del 2 del 3

(B)

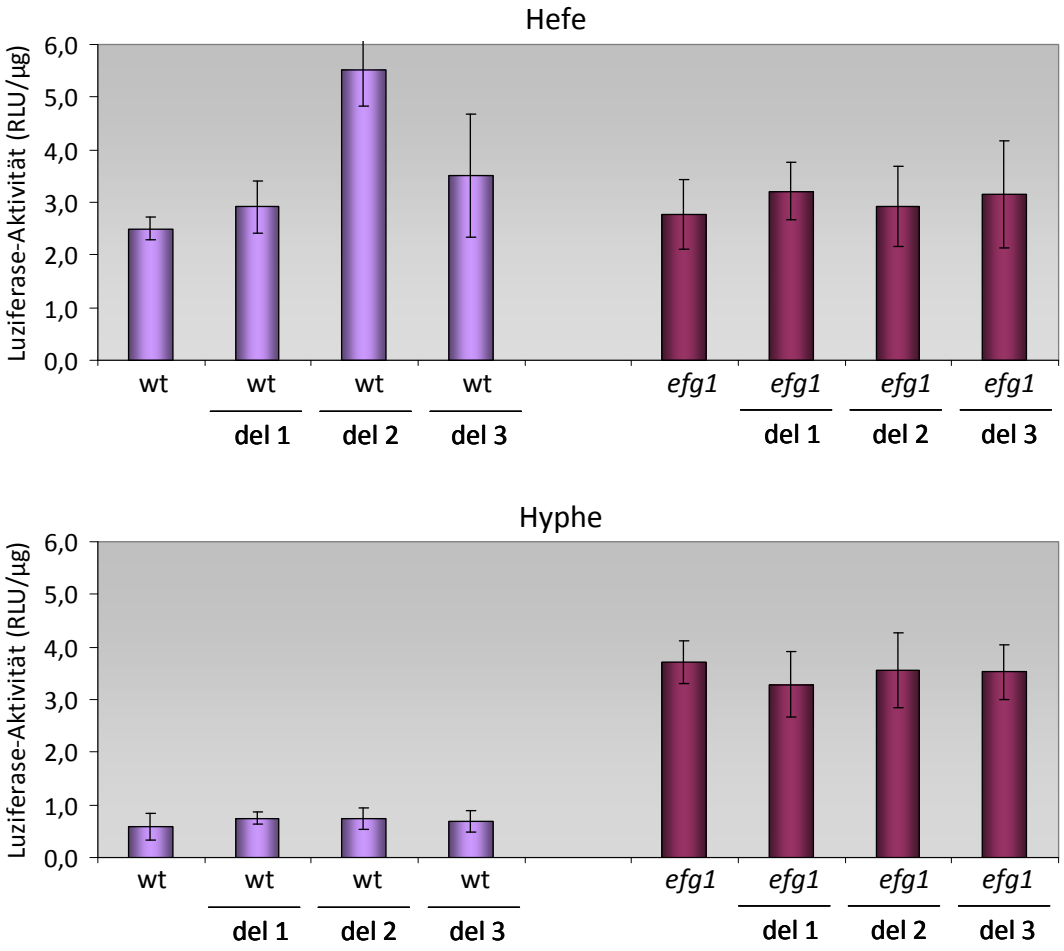


Abb. 3.7: *EFG1*-Promotoraktivität in Abhängigkeit verschiedener Deletionen innerhalb der 408 bp-Region unter Hefe- und Hyphenwachstum. (A) Sequenz der 408 bp-*EFG1*-Promotorregion nach Deletion der dreifachen EGR-Motivwiederholung mit stattdessen eingebauter *Bgl*II-Schnittstelle. Farblich gekennzeichnet sind die deletierten Bereiche del 1, del 2 und del 3 innerhalb der 408 bp-*EFG1p*-Region im Plasmid pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II. EGR-ähnliche Sequenzen sind grau umrandet (del 2-Region enthält ATGCAT; del 3-Region enthält TATGCAT). **(B)** Die drei Deletionsplasmide pSKM46e-Δ3xEGR-del1, pSKM46e-Δ3xEGR-del2 und pSKM46e-Δ3xEGR-del3 wurden jeweils in den *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms (CAI4) und der *efg1*-Mutante (HLC67)

integriert. Jeweils drei bis vier unabhängige Transformanten (wt-del 1; efg1-del 1; wt-del 2; efg1-del 2; wt-del 3; efg1-del 3) wurden wie in Abb. 3.3 beschrieben unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten ermittelt.

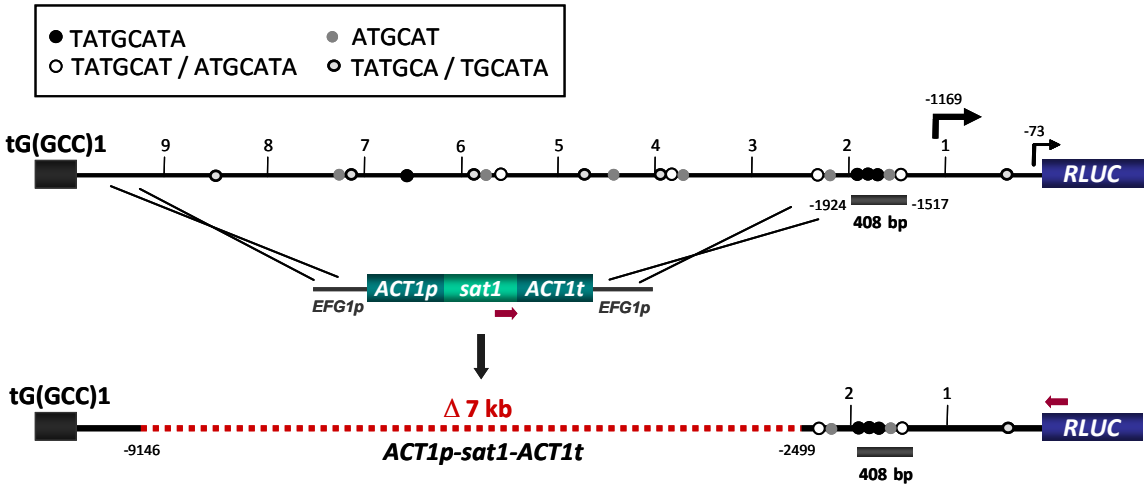
Die drei Deletionsregionen sind in Abb. 3.7 (A) gezeigt und wurden mittels Mutagenese-PCR in Plasmid pSKM46e-Δ3xEGR-*Bgl*II eingeführt. Dazu wurden folgende Primerpaare verwendet: Deletion 1 (del1): EFG1p-408bp-Muta 1_for/- rev, Deletion2 (del 2): EFG1p-408bp-Muta 2_for/-rev und Deletion3 (del 3): EFG1p-408bp-Muta 3_for/-rev.
Die Deletions-Plasmide (pSKM46e-Δ3xEGR-del1, -del2, -del3) wurden jeweils über die *Xho*I-Schnittstelle in den *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms (CAI4) und der *efg1*-Mutante (HLC67) integriert. Die Verifizierung der korrekten Integration erfolgte auf ähnliche Weise wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mittels Southern-Analyse (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Transformanten und die Referenzstämme ohne Deletion (ES2 und ES6) unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten der Rohextrakte bestimmt.
Wie aus Abb. 3.7 (B) hervorgeht, ist unter Hefewachstumsbedingungen im Wildtyp mit der Deletion 2 eine in Relation zum Kontroll-Wildtyp-Stamm erhöhte Luziferase-Aktivität feststellbar. Diese ist sogar höher als die Luziferase-Aktiviät der *efg1*-Mutante. Die übrigen Deletions-Varianten, del 1 und del 3, haben hingegen keine Auswirkungen auf die Regulation der *EFG1*-Promotoraktivität unter Hefewachstumsbedingungen. Unter Hyphen-induzierenden Konditionen haben weder die Deletion 2 (del 2) noch die anderen beiden Deletionsvarianten (del 1, del 3) einen Einfluss auf die *EFG1*-Promotoraktivität, denn im Fall aller drei Deletionen bleibt die Luziferase-Aktivität im Wildtyp im Vergleich zur *efg1*-Mutante deutlich (4- bis 6-fach) herabgesetzt.
Daher lässt sich zusammenfassen, dass die drei Deletionsbereiche (del 1, del 2, del 3) nicht notwendig für die Efg1-abhängige *EFG1*-Promotorrepression unter Hypheninduktionsbedingungen sind.

3.4.4 Deletion einer 7 kb großen *EFG1*-Promotorregion

Die intergene Region zwischen dem *EFG1*-ORF und dem nächsten stromaufwärts gelegenen Gen beträgt fast 10 kb und ist für das *C. albicans*-Genom überdurchschnittlich lang. Neben den drei EGR-Sequenzen (TATGCATA) innerhalb des 408 bp-Bereichs enthält die intergene *EFG1*-Promotorregion eine weitere stromaufwärts gelegene EGR-Box und zudem eine hohe Anzahl EGR-ähnlicher Sequenzen (TATGCAT/ATGCATA; ATGCAT; TATGCA/TGCATA) (Abb. 3.8). Es sollte daher untersucht werden, ob diese Motive in die negative Autoregulation von *EFG1* involviert sind. Dazu wurde eine fast 7 kb große Region stromaufwärts des 408 bp-*EFG1*-Promotorbereichs deletiert, welche elf EGR-ähnliche Sequenzen und eine perfekte EGR-Box (TATGCATA) enthält (Abb. 3.8 A). Unter Benutzung des Plasmids pFC1 wurde eine *ACT1p-sat1*-Disruptionskassette mittels PCR amplifiziert, die für Nourseothrizin-Resistenz kodiert. Dabei wurden Primer mit zum *EFG1*-Promotor homologen Sequenzüberhängen

verwendet, welche den zu deletierenden Bereich im Genom flankieren (EFG1p-SAT1-for und *EFG1p-SAT1(-2500-neu2)*-rev).

(A)



(B)

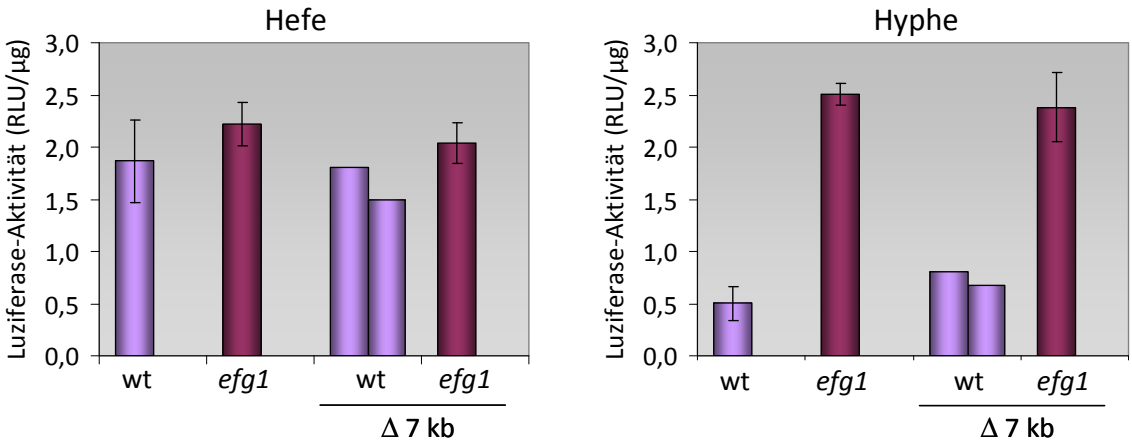


Abb. 3.8: Deletion einer 7 kb großen *EFG1*-Promotorregion. (A) Schematische Darstellung zur 7 kb großen *EFG1*-Promotordeletion. In den Ausgangsstämmen mit integrierter *EFG1p-RLUC*-Fusion (ES2, *EFG1*$^{+}$; ES6, *EFG1*$^{-}$) befindet sich der *RLUC*-ORF stromabwärts des *EFG1*-Promotors (im Wildtyp-Stamm anstelle des *EFG1*-ORFs). Zu sehen ist die etwa 10 kb lange intergene Region zwischen dem *RLUC*-Reportergen und dem nächsten 5´-Gen (tG(GCC)1). Die Positionen des EGR-Motivs (TATGCATA) sind durch schwarze Kreise markiert, während EGR-ähnliche Sequenzen durch weiße (TATGCAT / ATGCATA), graue (ATGCAT) oder graue, schwarz umrandete (TATGCA / TGCATA) Kreise gekennzeichnet sind. Die Transkriptionsstartpunkte des *EFG1*-Haupttranskripts (-1169 bp relativ zu ATG) und des kleineren *EFG1*-Transkripts (-73 bp) sind durch Pfeile verdeutlicht. Schematisch abgebildet ist die *ACT1p-sat1*-Disruptionskassette mit flankierenden *EFG1*-Promotorsequenzen, welche durch homologe Rekombination die Deletion des 7 kb-*EFG1p*-Bereichs in den Stämmen ES2 (wt) und ES6 (*efg1*) bewirkten. Die 7 kb-Deletionsregion ist als gepunktete Linie dargestellt. Primer-Positionen zur Verifizierung der *sat1*-Kassetten-Integration in das *RLUC*-Allel sind durch Pfeile (dunkelrot) markiert. Die entstandenen Stämme

wurden wt-Δ7kb und efg1-Δ7kb benannt. **(B)** *EFG1*-Promotoraktivität nach Deletion der 7 kb großen *EFG1*-Promotorregion. Zwei (wt-Δ7kb) bzw. drei (efg1-Δ7kb) unabhängige Transformanten mit deletierter 7 kb *EFG1*-Promotorregion im Wildtyp-Stammhintergrund ES2 und im *efg1*-Mutantenstamm ES6 wurden wie in Abb. 3.3 beschrieben unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen getestet. Im Fall der beiden Wildtyp-Δ7kb-Transformanten sind die Luziferase-Aktivitäten separat dargestellt, ansonsten sind der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung gezeigt.

Die *sat1*-Disruptionskassette wurde unter Selektion für Nourseothrizin-Resistenz über homologe Rekombination in den *EFG1*-Promotor der Wildtyp (ES2 1/2)- und der *efg1* (ES6 1/2*)*-Stämme integriert, welche die *EFG1p-RLUC*-Fusion (pSKM46e) ohne Deletion bereits im *EFG1*-Lokus trugen. Dabei wurde die ca. 7 kb lange *EFG1*-Promotorsequenz durch die *sat1*-Selektions-Kassette ersetzt und die korrekte Integration in das *EFG1p-RLUC*-Allel mittels PCR an isolierter, genomischer DNA überprüft (Primer: SAT1-term_for und Rück_Rluc_Kolo). Ein Deletions-Schema und die Positionen der zur Verifizierung verwendeten Primer können der Abb. 3.8 (A) entnommen werden. Der Vorwärts-Primer war dabei komplementär zur *sat1*-Sequenz und der Rückwärts-Primer hybridisierte an das *RLUC*-Gen. Das spezifische Amplifikationsprodukt beträgt ca. 2,6 kb und wurde bei zwei 7 kb-Deletions-Transformanten des Wildtyps (wt-Δ7kb) und drei 7 kb-Deletions-Transformanten der *efg1*-Mutante (efg1-Δ7kb) identifiziert (Daten nicht gezeigt).
Die ermittelten Luziferase-Aktivitäten sind in Abb. 3.8 (B) dargestellt. Sowohl unter Hefewachstums- als auch unter Hypheninduktionsbedingungen wurden keine Unterschiede in den *EFG1*-Promotoraktivitäten der Transformanten mit und ohne 7 kb-*EFG1*-Promotordeletion nachgewiesen.
Es lässt sich schlussfolgern, dass die 7 kb große *EFG1*-Promotorregion für die Efg1-vermittelte Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität, welche unter Hyphen-induzierenden Wachstumsbedingungen zu beobachten ist, nicht erforderlich ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass mehrere *EFG1*-Promotorregionen bzw. EGR-(ähnliche) Sequenzen in die negative Regulation des Promotors involviert sind und sich womöglich beim Wegfall eines regulatorischen Elements auch kompensieren können. Die Möglichkeit der EGR-Box-Redundanz ist durchaus in Betracht zu ziehen, da in keiner Deletionsvariante alle EGR-basierten Motive gleichzeitig ausgeschaltet waren.

3.4.5 Einfluss der 5´-UTR auf die *EFG1*-Promotoraktivität

EFG1 weist eine überdurchschnittlich lange 5´-untranslatierte Region (UTR) von fast 1,2 kb auf. Derart lange 5´-UTR-Bereiche sind charakteristisch für Transkriptionsfaktoren, die das hyphale Wachstum in *C. albicans* steuern (Sellam *et al.,* 2010). In einem Vorexperiment zeigte sich im Vergleich eines *C. albicans*-Stamms mit vorhandener *EFG1*-5´-UTR (KLC5.1; *EFG1*$^{+}$) und eines Stamms ohne die 5´-UTR (KLC9.1; *EFG1*$^{+}$) ein Unterschied in der Hyphenausbildung über einen Induktionszeitraum von 90 Minuten (YP-Medium mit 10 % Serum, 37 °C); so hatten mit der *EFG1*-5´-UTR 90 % aller Zellen Hyphen gebildet, während die Hyphenausbildung im Stamm ohne 5´-UTR um 10 % erniedrigt war (Daten nicht gezeigt).

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, welche Rolle die 5´-UTR für die *EFG1*-Promotoraktivität spielt und ob sie einen Einfluss auf die Reprimierung des *EFG1*-Promotors nimmt. Zu diesem Zweck wurde das *EFG1p-RLUC*-Fusion enthaltende Plasmid pSKM46e-Δ*Stu*I-*Hpa*I mit fast vollständig fehlender *EFG1*-5´-UTR in den Wildtyp-Stamm CAI4 und in die *efg1*-Mutante HLC67 transformiert. Die korrekte Plasmid-Integration in den endogenen *EFG1*-Promotor wurde auf ähnliche Weise wie in Abschnitt 3.4.1 mittels einer Southern-Analyse kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Mindestens drei unabhängige Transformanten und die Referenz-Transformanten mit vorhandener 5´-UTR wurden unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen analysiert.

Die entsprechenden Luziferase-Aktivitäten sind in Abb. 3.9 gezeigt. Unter Hefewachstumsbedingungen ist kein regulatorischer Unterschied in den *EFG1*-Promotoraktivitäten der Stämme ohne 5´-UTR im Vergleich zu den Stämmen mit 5´-UTR zu beobachten. Unter Hyphen-induzierenden Bedingungen bleibt die Luziferase-Aktivität im

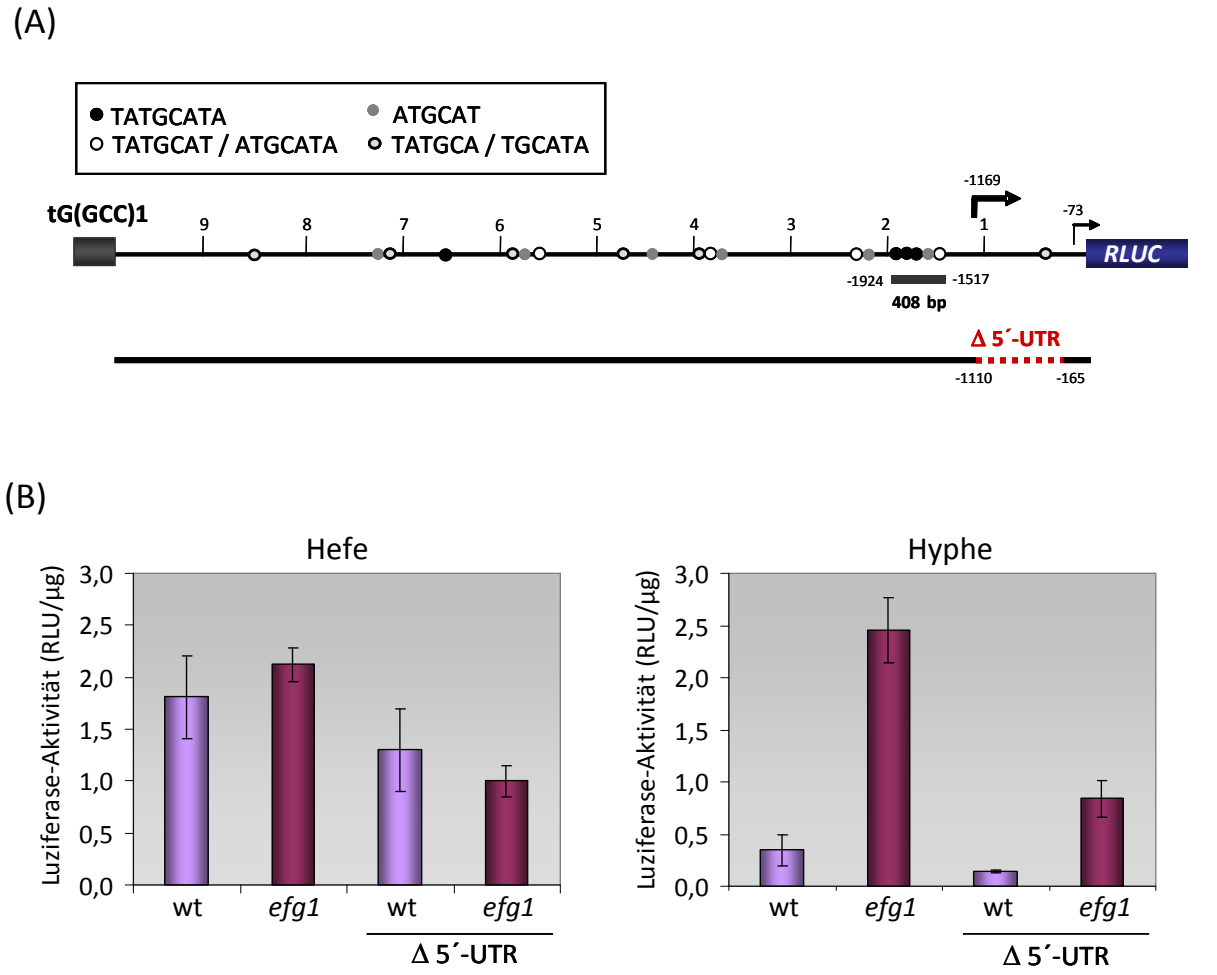


Abb. 3.9: *EFG1*-Promotoraktivität der 5´-UTR-Deletionsstämme unter Hefe- und Hyphenwachstum. (A) Schematisch dargestellt ist der *EFG1*-Promotor und die Position der *EFG1*-5´-UTR-Deletion (rote gepunktete Linie) nach Integration des Plasmids pSKM46e-Δ*Stu*I-*Hpa*I (*EFG1p*(Δ5´UTR*)-RLUC*) in den *EFG1*-Promotorlokus des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67. **(B)** Drei bis vier unabhängige Transformanten (wt-Δ5´UTR; efg1-Δ5´UTR) wurden wie in Abb. 3.3 angezogen und die Luziferase-Aktivitäten bestimmt.

Wildtyp auch ohne die 5´-UTR weiterhin herabgesetzt in Relation zur *efg1*-Mutante.
Es kann daher der Schluss gezogen werden, dass die 5´-UTR für die negative Autoregulation des *EFG1*-Promotors nicht notwendig ist. Auffällig sind jedoch die niedrigeren Luziferase-Aktivitätswerte unter Hypheninduktionsbedingungen im Wildtyp und in der *efg1*-Mutante mit fehlender 5´-UTR in Relation zu den Referenz-Stämmen. Auch unter Hefewachstumsbedingungen sind die gemessenen Promotor-Aktivitäten ohne die 5´-UTR etwas erniedrigt. Folglich könnte die 5´-UTR-Region für die Grundaktivität des *EFG1*-Promotors - vor allem unter Hyphen-induzierenden Bedingungen - eine Rolle spielen, während sie für die *EFG1*-Promotorrepression sehr wahrscheinlich nicht von Bedeutung ist.

3.4.6 Untersuchungen zur *EFG1*-Promotoraktivität im *RPS10*-Lokus

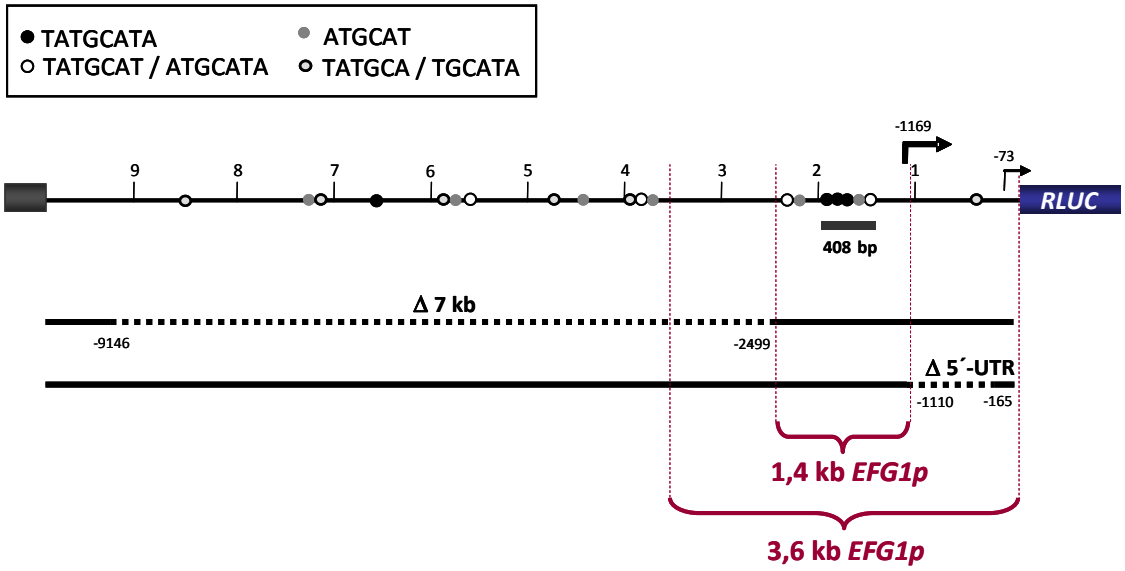
Durch die Nutzung der *RPS10*-Integrationsstelle, welche als neutraler Integrationsort gilt (Brand *et al.,* 2004), wurde die Aktivität bestimmter *EFG1*-Promotorbereiche gezielt untersucht. Dadurch sollte ein möglicher kompensatorischer Einfluss übriger EGR-basierter Sequenzen der 10 kb großen *EFG1*-Stromaufwärtsregion umgangen werden.

3.4.6.1 Analyse zur 1,4 kb-*EFG1*-Promotoraktivität im *RPS10*-Lokus

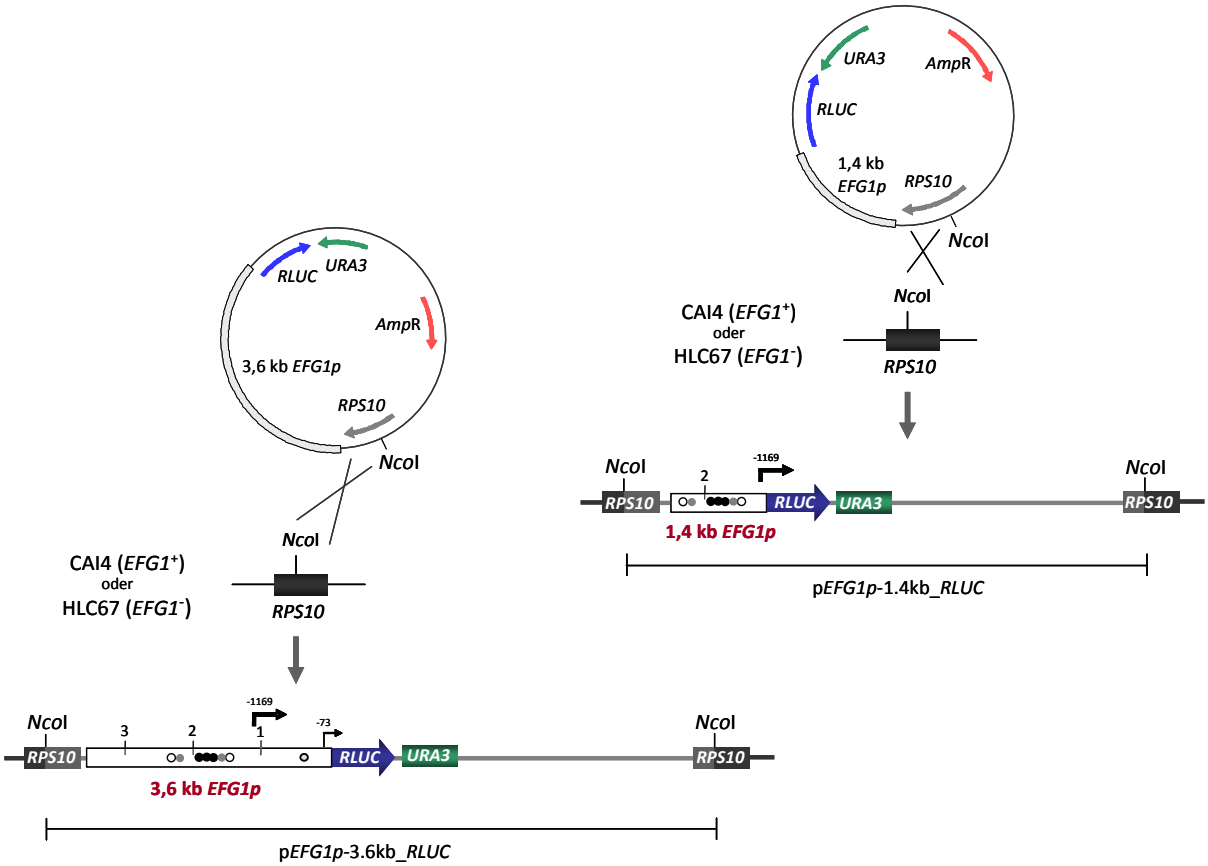
Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl die 5´-UTR als auch die große 7 kb-*EFG1*-Stromaufwärtsregion keinen Einfluss auf die Efg1-vermittelte negative *EFG1*-Promotorregulation haben. Es sollte nun analysiert werden, ob die dazwischen liegende ca. 1,4 kb-Region (Abb. 3.10 A) für die negative Auroregulation des *EFG1*-Promotors ausreichend bzw. notwendig ist. Das Übersichtsschema in Abb. 3.10 (A) visualisiert u. a. die Position des 1,4 kb-Promotorbereichs. Bisher wurden innerhalb dieser Region lediglich einzelne, kleinere Sequenzbereiche aus der 408 bp-Region entfernt, was jedoch keinen Effekt auf die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktiviät unter Hypheninduktionsbedingungen hatte. In diesem Teil wurde nun die gesamte ca. 1,4 kb-Region von der restlichen *EFG1*-Promotorsequenz ektopisch isoliert im *RPS10*-Lokus analysiert. Dazu wurde die 1,4 kb-Sequenz aus Plasmid pSKM46e unter Benutzung der Primer EFG1p_1370bp_XmaI-for-2 und EFG1p_1370bp_Nhe1-rev amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *Xma*I und *Nhe*I geschnitten und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pES2 stromaufwärts des Reportergens *RLUC* kloniert. Parallel wurde auf dieselbe Weise ein weiteres Plasmid mit der 3,6 kb langen *EFG1*-Promotorsequenz (inklusive der 5´-UTR) konstruiert (Abb. 3.10 A). Die Amplifikation des 3,6 kb-Fragments erfolgte ebenfalls aus Plasmid pSKM46e (*EFG1p-RLUC*) unter Verwendung der Primer EFG1p_-3400bp_XmaI-for und EFG1p_Inkl.minEFG1p_NheI-rev. Die Konstrukte wurden als p*EFG1p*-1.4kb_*RLUC* bzw. p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC* bezeichnet und durch Testrestriktionen und Sequenzierung (Primer: 1370bpEFG1p-Seq.GATC-for; 1370bpEFG1p-Seq.GATC-imRLUC-rev; Rück_Rluc_Kolo) überprüft. Die Plasmide wurden innerhalb des plasmidkodierten *RPS10*-

Gens über *Nco*I linearisiert und jeweils in den genomischen *RPS10*-Lokus des *C. albicans* Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert (3.10 B).

(A)



(B)



(C)

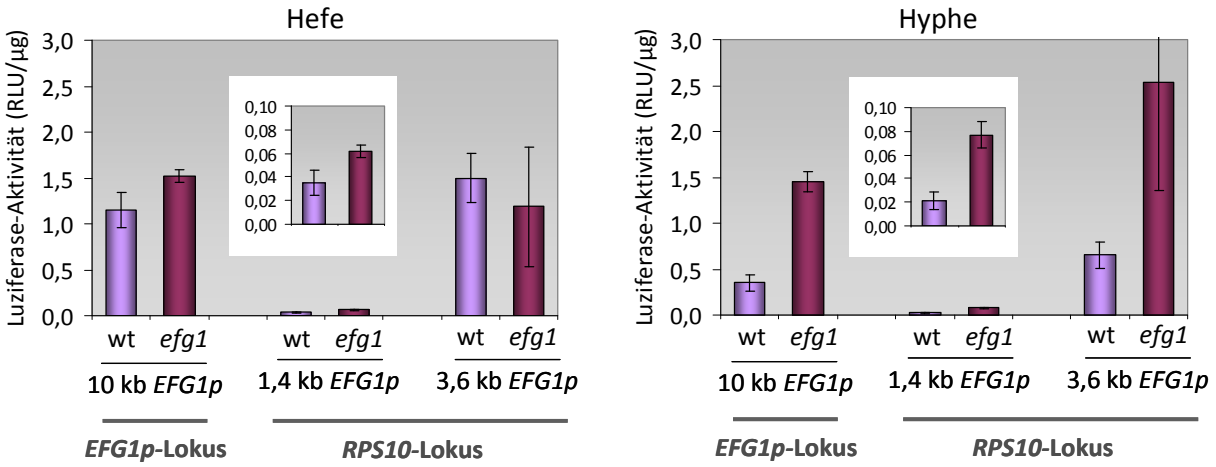


Abb. 3.10: *EFG1*-Promotoraktivität verschiedener *EFG1p-RLUC*-Fusionen im *RPS10*-Lokus. (A) Schematische Übersicht zu den 1,4 kb- und 3,6 kb-*EFG1*-Promotorregionen, welche aus Plasmid pSKM46e amplifiziert und jeweils an das *RLUC*-Gen in Plasmid pES2 fusioniert wurden; p*EFG1p*-1.4kb_*RLUC* und p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC.* **(B)** Schematische Darstellung der über die *Nco*I-Restriktionsschnittstelle integrierten Plasmide p*EFG1p*-1.4kb_*RLUC* und p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC* in den genomischen *RPS10*-Lokus des Wildtyp-Stamms CAI4 bzw. der *efg1*-Mutante HLC67. **(C)** Jeweils 4 - 5 unabhängige Transformanten (wt-3.6kb; efg1-3.6kb; wt-1.4kb; efg1-1.4kb) wurden wie in Abb. 3.3 beschrieben unter Hefewachstumsbedingungen und unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Als Referenz dienten die Wildtyp-Transformanten (ES2) und die *efg1*-Transformanten (ES6) mit integrierter *EFG1p-RLUC*-Fusion (pSKM46e) im nativen *EFG1*-Promotorlokus. Zusätzlich vergrößert dargestellt sind die Messergebnisse der 1,4 kb-*EFG1*-Promotorsequenz.

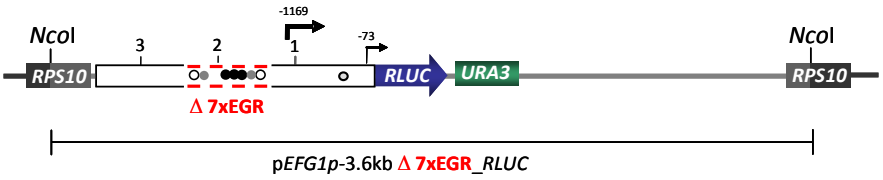
Die ermittelten Luziferase-Aktivitäten der Transformanten unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen sind in Abb. 3.10 (C) dargestellt. Die Aktivitäten des 3,6 kb-*EFG1*-Promotors im *RPS10*-Lokus des Wildtyps und der *efg1*-Mutante sind generell vergleichbar mit den Aktivitäten des gesamten 10 kb-*EFG1*-Promotors im nativen Lokus. Auffällig sind jedoch die starken Unterschiede bei den *efg1*-Transformanten, was sich in der höheren Standardabweichung widerspiegelt. Die Luziferase-Aktivitäten der 1,4 kb-*EFG1*-Promotorsequenz-Fusion sind unter beiden Wachstumsbedingungen extrem niedrig. Trotzdem scheint die negative Promotorregulation auch lediglich mit der 1,4 kb-*EFG1*-Promotorsequenz unter Hypheninduktionsbedingungen vorhanden zu sein. Bei der Messung unter Hefewachstumsbedingungen ist ein solcher Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *efg1*-Mutante nicht feststellbar, allerdings traten auch hier starke Schwankungen auf. Die 3,6 kb-*EFG1*-Promotorregion scheint für die Efg1-vermittelte negative Regulation des *EFG1*-Promotors unter Hyphen-induzierenden Bedingungen ausreichend zu sein, da nicht nur der relative Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *efg1*-Mutante mit dem am nativen Lokus vergleichbar ist, sondern auch die tatsächlichen Aktivitäts-Werte ähnlich hoch sind.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der Reporter-Aktivitäten im *RPS10*-Lokus darauf hin, dass die 1,4 kb-*EFG1*-Promotorregion eine Rolle bei der negativen Autoregulation des *EFG1*-Promotors spielt. Eine eindeutige Aussage ist jedoch aufgrund der schwankenden Messungen und der sehr niedrigen Luziferase-Werte nicht möglich.

3.4.6.2 Deletion der sieben EGR- und EGR-ähnlichen Boxen innerhalb der 3,6 kb-*EFG1*-Promotorsequenz

Die Resultate im vorherigen Abschnitt deuten darauf hin, dass die 1,4 kb *EFG1*-Promotorregion, welche sieben EGR- bzw. EGR-ähnliche Boxen enthält, wichtig für die negative *EFG1*-Promotorregulation ist. Die Luziferase-Aktivitätswerte waren jedoch generell sehr niedrig. Daher wurde für eine weitere Deletionsanalyse die 7 EGR-Boxen enthaltende *EFG1*-Promotorregion innerhalb des Plasmids p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC* entfernt (Abb. 3.11 A). Bei der Deletion wurde beachtet, dass der Bereich des *EFG1*-Transkriptionsstartpunkts erhalten bleibt. Durch die Integration in den *RPS10*-Lokus sollte eine mögliche regulatorische Wirkung durch weitere stromaufwärts gelegene EGR-(ähnliche) Boxen, wie sie im nativen *EFG1p*-Lokus vorkommen, ausgeschlossen werden. Die Mutagenese-PCR erfolgte am Plasmid p*EFG1p*-3.6kb_*RLUC* mit den Primern EFG1p-del6xARE-for und -rev. Das resultierende Plasmid p*EFG1p*-3.6kbΔ7xEGR_*RLUC* wurde über die singuläre Schnittstelle *Nco*I linearisiert und wie in Abb. 3.10 (B) gezeigt durch Transformation in den endogenen *RPS10*-Lokus des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert (Abb. 3.11 A). Die überprüften Transformanten und die Referenz-Transformanten mit der vollständigen 3,6 kb-*EFG1*-Promotorsequenz im *RPS10*-Lokus (wt-3.6kb; efg1-3.6kb) wurden unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten der Rohextrakte ermittelt (Abb 3.11 B).

(A)



(B)

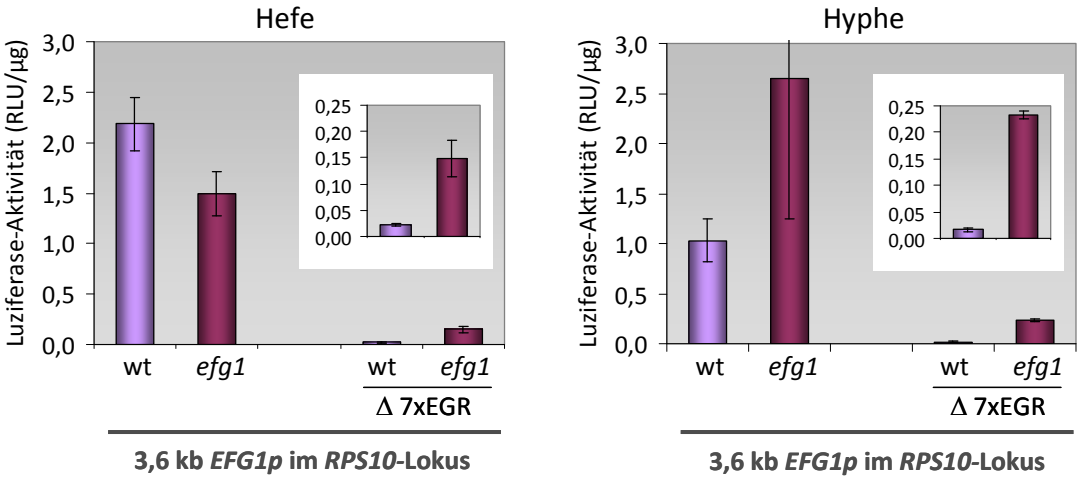


Abb. 3.11: *EFG1*-Promotoraktivität im *RPS10*-Lokus nach Deletion eines Promotorbereichs mit sieben EGR-(ähnlichen) Boxen. (A) Schematische Darstellung des integrierten Plasmids p*EFG1p*-3.6kbΔ7xEGR_*RLUC* im *RPS10*-Lokus des Wildtyp-Stamms (CAI4) und der *efg1*-Mutante (HLC67). Die Deletionsregion Δ 7xEGR ist durch rote gestrichelte Linien markiert. **(B)** Jeweils 4 - 5 unabhängige Transformanten (wt-3.6kb_Δ7xEGR; efg1-3.6kb_Δ7xEGR) wurden wie in Abb. 3.3 unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten ermittelt. Als Referenz dienten die Transformanten (wt-3.6kb und efg1-3.6kb) ohne Deletion innerhalb des 3,6 kb-*EFG1*-Promotors. Zusätzlich vergrößert dargestellt sind die Messergebnisse der 3,6 kb-Δ7xEGR-*EFG1*-Promotorsequenz-Fusion.

Unerwarteterweise waren die *EFG1*-Promotoraktivitäten im Falle der Δ 7xEGR-Deletion sehr niedrig, in etwa vergleichbar mit den Luziferase-Werten der 1,4 kb-*EFG1p*-Transformanten in Abschnitt 3.4.6.1 (Abb 3.10 C). Zwar wurde auch ohne die sieben EGR-Boxen eine herabgesetzte *EFG1*-Promotoraktivität im Wildtyp im Vergleich zu der *efg1*-Mutante unter Hypheninduktionsbedingungen gemessen, jedoch war auch die gleiche Regulation unter Hefewachstumsbedingungen festzustellen.

3.4.7 Die Sieben-EGR-Boxen-Region zeigt keinen Einfluss auf die *EFG1*-Promotorregulation im nativen Lokus

Im *RPS10*-Lokus wurde im Wildtyp ohne die 7x EGR-Motiv-Region eine reduzierte *EFG1*-Promotoraktivität unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen gemessen (Abschnitt 3.4.6.2; Abb. 3.11). Um zu prüfen, ob diese Deletion auch im nativen *EFG1*-Promotorlokus den gleichen Effekt hat, wurde die Region mit den sieben EGR- bzw. EGR-verwandten Boxen durch Mutagenese-PCR in Plasmid pSKM46e (*EFG1p-RLUC*) entfernt (Primer: EFG1p-del 7xARE-for/ -rev). Das veränderte Reporter-Plasmid, pSKM46e-Δ7xEGR, wurde wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben in den nativen *EFG1*-Promotor des Wildtyp-Stamms CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67 integriert. Transformanten mit einer singulären Plasmid-Kopie an korrekter Position wurden über eine Southern-Analyse verifiziert (Daten nicht gezeigt).
Wie anhand der Luziferase-Messungen in Abb. 3.12 zu sehen ist, hat die Deletion der Region mit den sieben EGR-(ähnlichen) Boxen keinen Einfluss auf die *EFG1*-Promotorregulation im nativen Lokus. Unter Hefewachstumsbedingungen wie unter Hypheninduktionsbedingungen zeigen die Deletions-Transformanten keinen Unterschied zu den Referenz-Transformanten (ohne Deletion) in den *EFG1*-Promotoraktivitäten auf (Abb. 3.12 B). Die unterschiedliche *EFG1*-Promotorregulation in den beiden Loki, *EFG1p* und *RPS10*, wird daher wahrscheinlich durch den unterschiedlichen Sequenzkontext verursacht.
Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die 408 bp-Region des *EFG1*-Promotors für die Reprimierung der *EFG1*-Promotoraktivität unter Hypheninduktionsbedingungen nicht absolut notwendig ist, obwohl der Transkriptionsfaktor Efg1 *in vitro* an diese Region bindet. Da aber immer noch weitere EGR-verwandte Motive und eine EGR-Box direkt stromaufwärts der 7xEGR-Deletionsregion liegen, könnten diese zumindest im Falle der Deletion Bindestellen für Efg1 darstellen.

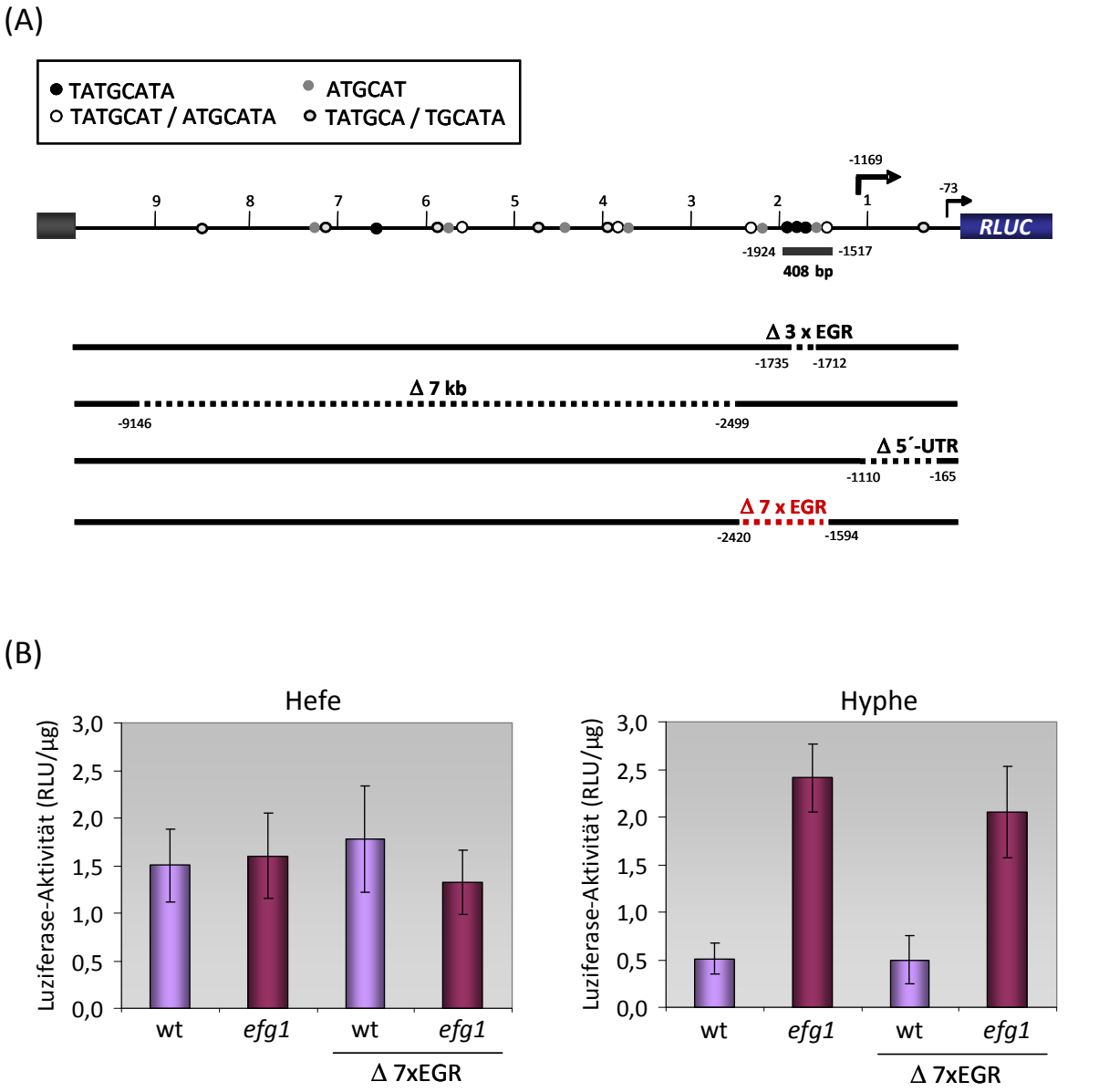


Abb. 3.12: *EFG1*-Promotoraktivität nach der Δ 7xEGR-Deletion im *EFG1*-Promotor unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen. (A) Schema zur Position der 7xEGR-Deletion (gepunktete rote Linie) innerhalb des *EFG1*-Promotors nach Integration der *EFG1p*(Δ7xEGR)-*RLUC*-Fusion (pSKM46e-Δ7xEGR) in den *EFG1*-Promotorlokus des Wildtyps CAI4 und der *efg1*-Mutante HLC67. **(B)** Jeweils 4 unabhängige Transformanten (wt-Δ7xEGR; efg1-Δ7xEGR) wurden wie in Abb. 3.3 beschrieben unter Hefewachstums- und unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten der Rohextrakte ermittelt.

3.5 Negative Autoregulation von *EFG1*

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob neben Efg1 weitere Proteine den *EFG1*-Promotor negativ regulieren. Zu diesem Zweck wurde das *EFG1p-RLUC*-Fusionsplasmid pSKM46e in den *EFG1*-Promotorlokus verschiedener Mutanten-Stämme durch Transformation integriert. Die den Mutanten fehlenden Gene spielen bei der Regulation des

hyphalen Wachstums eine Rolle oder haben eine Funktion bei der Repression der Gentranskription durch das Verschließen der Chromatinstruktur.

- Tpk1 und Tpk2
  Die für die pSKM46e-Integration verwendeten Stämme IIHH6-4a bzw. AS1 weisen eine Mutation in den Genen *TPK1* bzw. *TPK2* auf. Diese kodieren für die beiden katalytischen Untereinheiten der PKA, Tpk1 und Tpk2. Die beiden PKA-Isoformen befinden sich im Efg1-Signaltransduktionsweg direkt oberhalb von Efg1 und sind für die Ausbildung von Hyphen notwendig. Es konnten Hinweise erhalten werden, dass der Tanskriptionsfaktor Efg1 durch die PKA-Isoformen Tpk1/Tpk2 phosphoryliert wird und dadurch das hyphale Wachstum induziert wird (Bockmühl and Ernst, 2001).
- Flo8
  Der Stamm CCF4 weist eine Disruption des *FLO8*-Gens auf. Für den Transkriptionsfaktor Flo8 wurde gezeigt, dass er mit Efg1 interagieren kann und viele gleiche Gengruppen wie Efg1 reguliert. Es wird angenommen, dass Efg1 zusammen mit Flo8 die Ausbildung von Hyphen steuert (Cao *et al.,* 2006; Noffz *et al.,* 2008).
- Czf1
  Der Stamm CKY157 besitzt eine Mutation im Gen *CZF1*. Für den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Czf1 konnte ebenfalls eine Interaktion mit Efg1 nachgewiesen werden. Unter eingebetteten Wachstumsbedingungen wirkt Czf1 als Gegenspieler von Efg1 und induziert die Hyphenbildung, indem es den Repressoreffekt von Efg1 unter sauerstoffarmen Verhältnissen unterdrückt (Brown *et al.,* 1999; Guisani *et al.,* 2002). Im Gegensatz zum Wachstum unter Normoxie agiert Efg1 unter hypoxischen Bedingungen nämlich als Repressor der Hyphenbildung (Setiadi *et al.,* 2006).
- Sin3
  Der Stamm SFC4 weist eine Deletion im *SIN3*-Gen auf. Das Protein Sin3 ist eine Komponente des Sin3-Rpd3-Histon-Deacetylase-Komplexes, welcher in die Regulation der transkriptionellen Gen-Repression involviert ist. Durch ChIP-Analysen wurde gezeigt, dass Sin3 an den *EFG1*-Promotor bindet und auch fähig ist mit Efg1 *in vivo* zu interagieren (Tebarth *et al.,* 2003; Doedt, 2003). Die *sin3*-Mutante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm keinen *EFG1*-Transkriptabfall während der Hypheninduktion auf und bildet statt echter Hyphen Pseudohyphen, von welchen wiederum Hefezellen abknospen. Es wird vermutet, dass Efg1 seine eigene Transkription unter Mitwirkung des Sin3-Rpd3-Komplexes reprimiert (Tebarth *et al.,* 2003).

Die Überprüfung auf eine korrekte und singuläre Integration des Plasmids pSKM46e in den *EFG1*-Promotorlokus der verschiedenen Mutanten-Stammhintergründe fand wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mittels Southern-Blot-Analysen statt (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 3.13 sind die Luziferase-Aktivitäten des Wildtyps (ES2), der *efg1*-Mutante (ES6) und der übrigen Mutanten-Stämme mit integrierter *EFG1p-RLUC*-Fusion zu sehen. Unter Hefewachstumsbedingungen ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten bezüglich der *EFG1*-Promotoraktivität feststellbar. Unter Hyphenwachstumsbedingungen hingegen kann eine zum Wildtyp-Stamm erhöhte Luziferase-Aktivität nicht nur in der *efg1*-, sondern auch in der *tpk2*-Mutante und - wenn auch in einem etwas geringeren Ausmaß - in der *flo8*-Mutante detektiert werden.

Aufgrund der Ergebnisse wird angenommen, dass neben Efg1 selbst auch die Tpk2-Isoform, nicht aber die Tpk1-Isoform der PKA, wichtig für die negative *EFG1*-Promotorregulation unter den getesteten Hypheninduktionsbedingungen ist. Darüber hinaus ist auch der Transkriptionsfaktor Flo8 in die Efg1-vermittelte *EFG1*-Promotorrepression involviert. Entgegen der Erwartungen konnte aber kein Einfluss der Sin3-Histondeacetylase-Komplex-Komponente auf die Herunterregulation der *EFG1*-Promotoraktivität festgestellt werden. Unter den gegebenen Hypheninduktionsbedingungen war auch Czf1 in die *EFG1*-Promotorregulation nicht involviert.

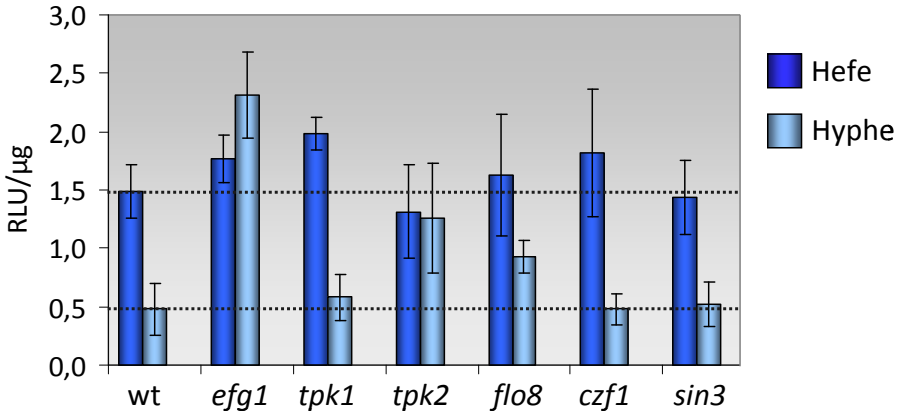


Abb. 3.13: *EFG1*-Promotoraktivität verschiedener *C. albicans*-Mutanten. Das Plasmid pSKM46e (*EFG1p-RLUC* Fusion) wurde in den endogenen *EFG1*-Promotorlokus verschiedener Mutantenstämme (IIHH6-4a, *tpk1*; AS1, *tpk2*; CCF4, *flo8*; CKY157, *czf1*; SFC4, *sin3*) über eine *Xho*I-Plasmidlinearisierung integriert. Drei bis fünf unabhängige Transformanten eines jeden Stamms und die Vergleichsstämme (wt; ES2 bzw. *efg1*-Mutante; ES6) wurden wie in Abb. 3.3 beschrieben unter Hefewachstumskonditionen und unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Luziferase-Aktivitäten ermittelt. Gestrichelte Linien zeigen die Höhe der Rluc-Aktivität im Wildtyp (wt) unter Hefe- bzw. Hyphenwachstumsbedingungen an. Stämme/Transformanten: tpk1-TL (*tpk1*); tpk2-TL (*tpk2*); flo8-TL (*flo8*); czf-TL (*czf1*); sin3-TL (*sin3*).

3.6 Analysen zur Regulation der *SAP2*-Promotoraktivität durch Efg1

Das *SAP2*-Gen kodiert für eine von zehn sauren Aspartylproteasen in *C. albicans,* welche zur Virulenz des Pilzes beitragen (Hube *et al.,* 1997). Deren Sekretion erleichtert unter anderem die Penetration von Epithel- und Endothelzellen und unterstützt das Vordringen in tiefere Gewebeschichten. In genomweiten Transkriptomanalysen wurde *SAP2* als ein Efg1-reguliertes Gen identifiziert (Doedt, 2003). Innerhalb des *SAP2*-Promotors können verschiedene potentielle Efg1-Bindessequenzen, wie das MCB-Element (ACGCGT), die E-Box (CANNTG) oder das EGR-Kernmotiv (ATGCAT), gefunden werden. Daher sollte der Einfluss einiger dieser Motive und Sequenzabschnitte hinsichtlich der *SAP2*-Promotorregulation in Abhängigkeit von Efg1 untersucht werden. In Reporterstudien wurde bereits gezeigt, dass der *SAP2*-Promotor Efg1-abhängig reprimiert wird (Doedt, 2003). So ist die *SAP2*-Promotoraktivität im Wildtyp deutlich reduziert im Vergleich zur *efg1*-Mutante. Der reprimierende Effekt war jedoch nicht mehr zu beobachten, wenn nur etwa die Hälfte der

untersuchten *SAP2*-Promotorsequenz (550 bp) an das Reportergen *RLUC* fusioniert war, so dass gefolgert wurde, dass für die Reprimierung durch Efg1 die Region stromaufwärts des 550 bp-*SAP2*-Promotors verantwortlich ist.

Die *SAP2*-Promotorregion enthält ein singuläres MCB-Element (ACGCGT), welches ein potentielles Bindemotiv für Efg1 darstellt (Doedt, 2003; Hilbig, 2004). Das Entfernen des MCB-Motivs (521 bp stromaufwärts vom Translationsstart) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Efg1-vermittelte Repression des *SAP2*-Promotors (Doedt, 2003). Eine weitere Analyse der 1050 bp großen *SAP2*-Promotorsequenz ergab, dass 979 bp und 292 bp stromaufwärts vom ATG jeweils eine E-Box (CANNTG) vorhanden ist (Abb. 3.14). Diese stellt ebenfalls eine potentielle Bindesequenz für den Transkriptionsfaktor Efg1 dar (Stoldt *et al.,* 1997) und wurde als Erkennungssequenz vieler anderer bHLH-Transkriptionsfaktoren beschrieben. Des Weiteren stellte sich heraus, dass der *SAP2*-Promotor zwei EGR-Kernmotive (ATGCAT) 588 bp und 295 bp stromaufwärts des ATG aufweist (Abb. 3.14).

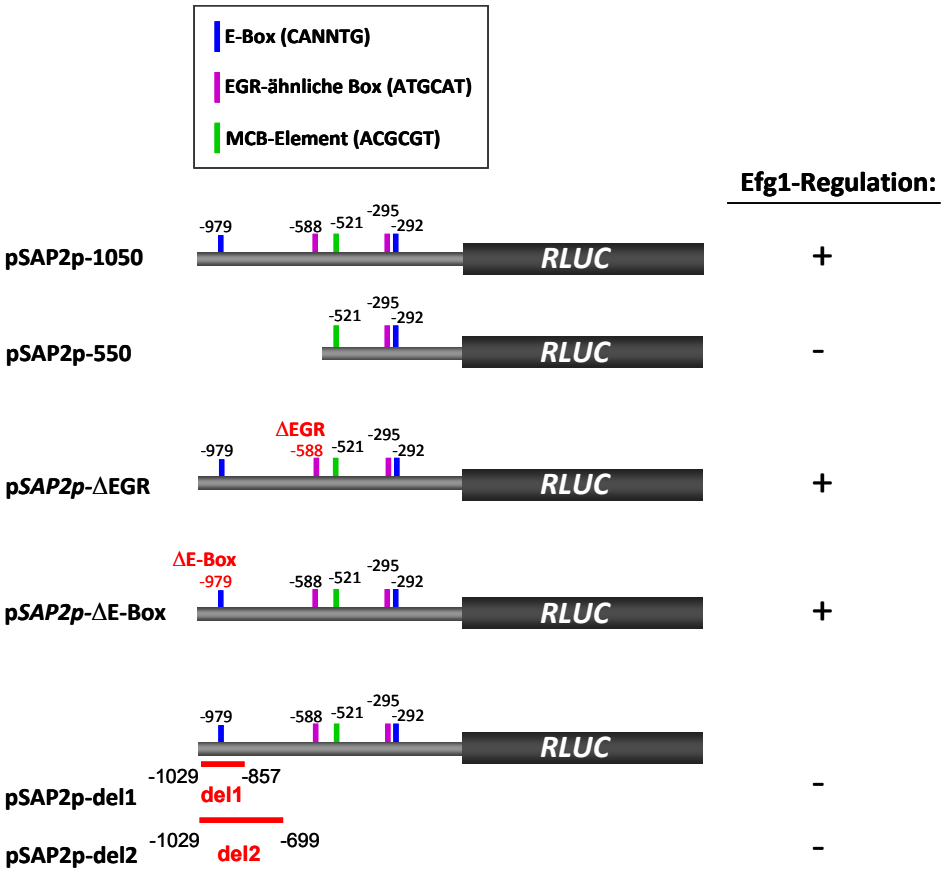


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der verwendeten *SAP2*-Promotorkonstrukte. Das Plasmid pSAP2p-1050 enthält die 1050 bp große *SAP2*-Promotorsequenz, welche an das *RLUC*-Reportergen fusioniert ist. Das Plasmid pSAPp-550 weist einen 550 bp langen *SAP2*-Promotor auf. Die Plasmide pSAP2p-ΔEGR, pSAP2p-ΔE-Box, pSAP2p-del1 und pSAP2p-del2 wurden durch Mutagenese-PCR auf pSAP2p-1050 generiert und weisen eine Deletion der EGR-verwandten Sequenz ATGCAT (-588 bp zu ATG), der E-Box CAAATG (-979 bp zu ATG), der *SAP2p*-Sequenz del1 (-1029 bp bis -857 bp) oder der *SAP2p*-Sequenz del2 (-1029 bp bis -699 bp) auf. Ein Plus (+) bzw. ein Minus (-) kennzeichnet, ob eine Efg1-abhängige Regulation im Fall des entsprechenden *SAP2p*-Konstrukts aufgetreten ist oder nicht (Luziferase-Messungen und Stammnamen in Abb. 3.15 und Abb. 3.16).

Um zu überprüfen, ob der *SAP2*-Promotor über die weiter stromaufwärts von Position -550 gelegene EGR-verwandte Sequenz (-588 bp; ATGCAT) bzw. die E-Box (-979 bp; CAAATG) durch Efg1 reguliert wird, wurden diese Sequenzen innerhalb des 1050 bp-*SAP2*-Promotors deletiert. Durch Mutagenese-PCR auf dem Plasmid pSAP2p-1050 (*SAP2p-RLUC*) entstanden die Plasmide p*SAP2p*-ΔEGR (SAP2p-delATGCAT-vor/-rück) und p*SAP2p*-ΔE-Box (SAP2p-delCAAATG(E-box)-vor/-rück), welche durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft wurden (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte deren Linearisierung innerhalb des plasmideigenen *RPS10*-Gens mit dem Restriktionsenzym *Nco*I und die jeweilige Integration in den chromosomalen *RPS10*-Lokus des Wildtyps CAI4 und der *efg1*-Deletionsmutante HLC67. Auf die gleiche Weise wurden die Plasmide pSAP2p-1050 bzw. pSAP2p-550 ohne Deletion als Referenz integriert. Mittels Southern-Blot-Analysen wurden die Plasmid-Integrationen jeweils in einfacher Kopie an korrekter Stelle im Genom verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Transformanten der vier verschiedenen *SAP2*-Promotorkonstrukte wurden im YCB-BSA-Medium (ÜN-Vorkulturen in YPD-Medium) bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,8 angezogen, da in diesem Medium die höchste *SAP2*-Promotoraktiviät vorliegt (Doedt, 2003). Die ermittelten Luziferase-Werte der Transformanten sind in Abb. 3.15 dargestellt. Im Fall des 1050 bp-*SAP2*-Promotors wurde im Wildtyp-Stamm (*EFG1*$^{+}$) eine etwa vierfach niedrigere Aktivität in Relation zum *efg1*-Deletionsstamm gemessen, wodurch die Efg1-bedingte Repression erneut bestätigt wurde. Bei dem kürzeren 550 bp-*SAP2*-Promotor war kein Unterschied in der Luziferase-Aktivität zwischen dem Wildtyp und der *efg1*-Mutante messbar und des Weiteren war auch eine generell etwa um den Faktor zwei niedrigere

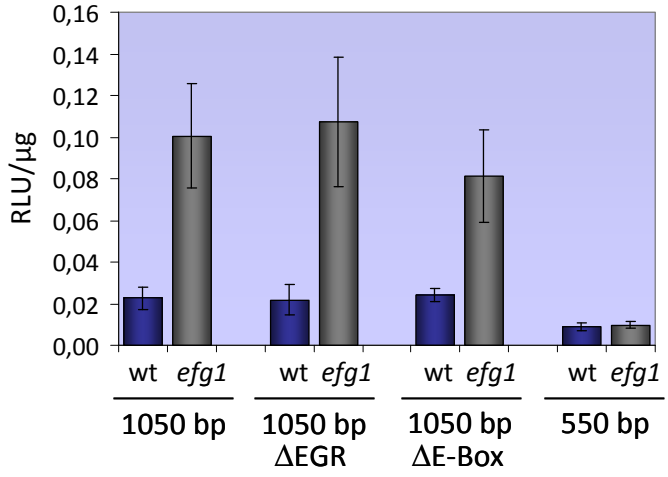


Abb. 3.15: *SAP2*-Promotoraktivität. Vier verschiedene *SAP2p-RLUC*-Konstrukte (pSAP2p-1050, pSAPp-550, pSAP2p-ΔEGR und pSAP2p-ΔE-Box) wurden jeweils in den *RPS10*-Lokus (*Nco*I) des Wildtyp-Stamms (CAI4) und der *efg1*-Mutante (HLC67) integriert. Jeweils drei bis vier unabhängige Transformanten wurden in YCB-BSA-Medium bei 30 °C angezogen und die Luziferase-Aktivitäten und Standard-abweichungen bestimmt. Stämme: C-SAP2p(1050); H-SAP2p(1050); C-SAP2p(550); H-SAP2p(550); C-SAP2p(ΔEGR); H-SAP2p(ΔEGR); C-SAP2p(ΔEbox) und H-SAP2p(ΔEbox), wobei C für den Wildtyp CAI4 (wt; *EFG1*$^{+}$) und H für die *efg1*-Mutante HLC67 (*efg1*; *EFG1*$^{-}$) steht.

Promotor-Grundaktivität feststellbar. Wie auch schon in der Arbeit von Doedt (2003) gefolgert wurde, musste die Sequenz, welche bei der Efg1-vermittelten *SAP2*-Promotor-Reprimierung eine Rolle spielt, stromaufwärts der 550 bp-*SAP2*-Promotorregion liegen. Nach der Deletion der EGR-ähnlichen Sequenz ATGCAT oder der E-Box CAAATG blieb die Herabregulation der *SAP2*-Promotoraktivität im Wildtyp jedoch weiterhin bestehen. Daher wird angenommen, dass keines der beiden Sequenz-Motive für die Efg1-vermittelte *SAP2*-Promotorrepression von Bedeutung ist.

Als nächstes wurde damit begonnen größere Bereiche des *SAP2*-Promotors oberhalb der 550 bp-Region zu deletieren, um den für die Repression notwendigen Bereich näher einzugrenzen. Die beiden Deletions-Konstrukte pSAP2p-del1 (*SAP2p*-Mutagenese-1_vor/-rück) bzw. pSAP2p-del2 (*SAP2p*-Mutagenese-2_vor/-rück) wurden wie oben beschrieben in den *RPS10*-Lokus des Wildtyp-Stamms CAI4 integriert und die Transformanten entsprechend im YCB-BSA-Medium angezogen.
Die gemessenen Luziferase-Aktivitäten sind in Abb. 3.16 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Deletionsregionen, del1 und del2, in die *SAP2*-Promotorrepression nicht involviert sind, wobei zu beachten ist, dass die größere del2-Region auch die del1-Region beinhaltet (s. Abb. 3.14). Ansonsten würde man einen Anstieg der *SAP2*-Promotoraktivität in Relation zur Referenz (1050 bp-*SAP2*-Promotor ohne Deletion) erwarten, so dass das Aktivitäts-Level ungefähr auf Höhe des *efg1*-Deletionsstamms (ca. 0,1 RLU/µg) wäre (vergl. Abb. 3.15). Stattdessen deuten die erniedrigten Messwerte im Wildtyp

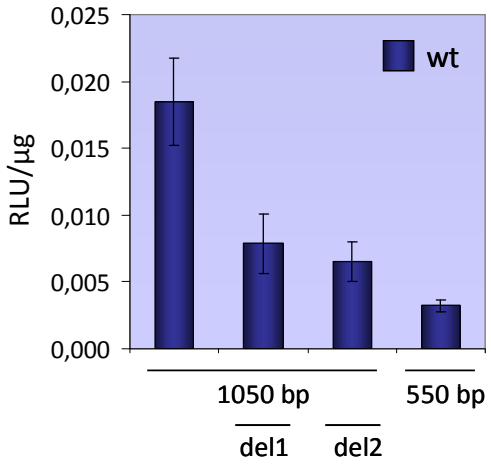


Abb. 3.16: *SAP2*-Promotoraktivität. Die *SAP2p-RLUC*-Konstrukte pSAP2p-del1 und pSAP2p-del2 wurden jeweils in den *RPS10*-Lokus des Wildtyp-Stamms CAI4 integriert. Jeweils drei bis vier unabhängige Transformanten und die Referenz-Transformanten (mit 1050 bp-*SAP2p* und 550 bp-*SAP2p*) wurden wie in Abb. 3.15 in YCB-BSA-Medium angezogen und die Luziferase-Aktivitäten bestimmt. Stämme: C-SAP2p(1050); C-SAP2p(del1); C-SAP2p(del2) und C-SAP2p(550).

darauf hin, dass die Regionen del1 und del2 für die Grundaktivität des *SAP2*-Promotors von Bedeutung sind, jedoch keine Funktion bei der durch Efg1 regulierten Promotor-Repression besitzen.
Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wird angenommen, dass die nicht untersuchte verbleibende Region zwischen -550 bp und -699 bp (Abb. 3.14) für die *SAP2*-Promotor-Repression verantwortlich sein kann.

3.6.1 Untersuchung zur Bindung von Efg1 an den *SAP2*-Promotor

In diesem Abschnitt wurde die mögliche Bindung des Transkriptionsfaktors Efg1 an den *SAP2*-Promotor *in vitro* mit Hilfe einer Gelretardierungsanalyse untersucht. Mittels PCR wurden ausgehend vom Plasmid p*SAP2p*-1050 zwei *SAP2*-Promotorfragmente amplifiziert, zum einen das Fragment *SAP2p*_A von -1049 bp bis -536 bp (mit den Primern SAP2p(1050bp)-for und SAP2p(+600bp)-rev) und zum anderen das Fragment *SAP2p*_B von -550 bp bis -2 bp (mit den Primern SAP2p(-550bp)-for und SAP2p(1050bp)-rev) (Abb. 3.17).

Letzteres sollte als Negativ-Kontrolle dienen, da eine Efg1-Bindung an die 550 bp-*SAP2*-Promotorsequenz aufgrund der bisherigen Ergebnisse ausgeschlossen wurde (s. Abschnitt 3.6). Beide DNA-Fragmente wurden wie in 2.6.6 beschrieben an den 5´-Enden radioaktiv markiert und mit verschiedenen Mengen Rohextrakt (5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg) des Wildtyp-Stamms CAI4 oder des *efg1*-Deletionsstamms HLC67 inkubiert. Die Kontrollen enthielten keinen Rohextrakt, sondern nur radioaktivmarkierte DNA (*SAP2p* _A oder *SAP2p*_B). Da es sich um einen Vorversuch handelte, sollte zunächst auf weitere Kontrollen verzichtet werden. Erwartet wurde eine Verzögerung des Fragments *SAP2p*_A in Anwesenheit des Efg1 enthaltenden Wildtyp-Rohextrakts, da diese Region durch die Rluc-Reporterstudien als notwendig für die Efg1-vermittelte *SAP2*-Promotorreprimierung eingegrenzt werden konnte (Abschnitt 3.6). Die Gelretardierungs-Ergebnisse zeigten jedoch eine Verzögerung

Abb. 3.17: Schematische Darstellung der für die Gelretardierung eingesetzten *SAP2*-Promotorfragmente. Die beiden Fragmente *SAP2p*_A von -1049 bp bis -536 bp (relativ zum ATG) und *SAP2p*_B von -550 bp bis -2 bp wurden von Plasmid p*SAP2p*-1050 amplifiziert und für die Gelretardierungsanalyse benutzt.

beider *SAP2p*-Fragmente (A und B) sowohl mit den Rohextrakten des Wildtyps als auch der *efg1*-Mutante (Daten nicht gezeigt). Dieses Experiment müsste daher mit aufgereinigtem Efg1-Protein durchgeführt werden, um eine *SAP2*-Promotorbindung durch andere Efg1-unabhängige Proteine in den Rohextrakten ausschließen zu können. Durch spätere ChIP-chip-Analysen in dieser Arbeit konnte eine Bindung von Efg1 an den *SAP2*-Promotor *in vivo* allerdings nicht bestätigt werden, was auf eine indirekte Regulation des *SAP2*-Promotors durch Efg1 hinweist.

3.7 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) zur Untersuchung der Efg1-Bindung in *C. albicans*

In einer früheren ChIP-Analyse wurde die Bindung von Efg1 an dessen Promotor nachgewiesen (Tebarth *et al.,* 2003; Doedt, 2003). Dieses wurde für eine *EFG1*-Promotorregion unmittelbar stromaufwärts des Haupttranskriptionsstarts gezeigt, jedoch wurden andere Bereiche - wie die 408 bp-Promotorregion - nicht überprüft. In diesem Teil der Arbeit sollte die gesamte Stromaufwärtsregion des *EFG1*-ORFs einer ChIP-Analyse unterzogen werden. Durch die Erzeugung kürzerer Chromatinfragmente und unter Verwendung mehrerer Primerpaare wurde versucht, die Efg1-Bindung an den *EFG1*-Promotor genauer zu lokalisieren.

3.7.1 Vorversuch zur Antikörper-Spezifität

In einem Vorversuch sollte mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse überprüft werden, ob der zu verwendende Antikörper für die ChIP-Untersuchungen spezifisch HA-Efg1 bindet und präzipitiert. Zu diesem Zweck wurden der HA-Efg1-produzierende Stamm HLCEEFG1 und als Kontrolle der Stamm SC5314 ohne HA-Epitop am Efg1 in YPD-Medium bei 30 °C in der Hefeform angezogen. Zur Fixierung der Protein-DNA-Bindungen wurden die Kulturen mit Formaldehyd inkubiert. Im Anschluss wurde das Chromatin isoliert und durch Sonifikation fragmentiert. Ein kleiner Anteil (1/10) wurde jeweils als Input-Probe abgenommen und der Rest des Chromatins wurde für die Immunpräzipitation mit einem Anti-HA-Antikörper, welcher an magnetische Protein G-Beads gekoppelt worden war, eingesetzt. Die IP-Proben (ChIP) beider Stämme wurden in SDS-Probenpuffer (40 µl) aufgenommen und für 30 Minuten bei 95 °C inkubiert, wodurch die Quervernetzungen zwischen Proteinen und DNA-Fragmenten und zwischen Proteinen untereinander aufgehoben wurden. Anschließend wurden die Proben von den magnetischen Beads gelöst und die Proteine (30 µl bzw. 10 µl von 40 µl-Proben) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positiv- und Negativ-Kontrollen dienten die Rohextrakte (RE) der Stämme HLCEEFG1 und SC5314, die Input-Proben und außerdem wurden die Überstände nach der Immunpräzipitation (IP-ÜS) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HA-Antikörper, der auch für die Immunpräzipitation verwendet worden war.

In Abb. 3.18 ist das Ergebnis der Immunoblot-Analyse dargestellt. In den beiden ChIP-Spuren des Stamms HLCEEFG1 (30 µl und 10 µl; Spur 7 und 10) ist jeweils eine deutliche HA-Efg1-Bande bei der erwarteten Laufhöhe von ca. 84 kDa (roter Pfeil) zu erkennen, die in den ChIP-Spuren des Kontrollstamms SC5314 ohne HA-Epitop (Spur 6 und 9) nicht auftritt (vergl. ebenso Kontrollen in Spur 1, 2 und 4, 5). Die ChIP-Spuren des Stamms SC5314 weisen keine unspezifischen Banden auf, was eine spezifische Immunpräzipitation zeigt. Bei den mehreren schwächeren Banden in den ChIP-HLCEEFG1-Spuren unterhalb der erwarteten Laufhöhe handelt es sich vermutlich um HA-Efg1-Abbaupodukte, welche möglicherweise durch das intensive Aufschlussverfahren und die vielen Sonifikationszyklen entstanden sind. Die distinkte Bande bei etwa 25 kDa (Abb. 3.18; Spur 6, 7, 9, 10) ist wahrscheinlich auf das

Protein G zurückzuführen, welches bei der 95 °C-Inkubation im SDS-Ladepuffer von den Beads abgetrennt wurde. Das verwendete *E. coli*-Protein G hat zwar eine theoretische molekulare Masse von 17 kDa, kann aber nach Herstellerinformationen je nach Gel- und Puffersystem auch höher laufen.

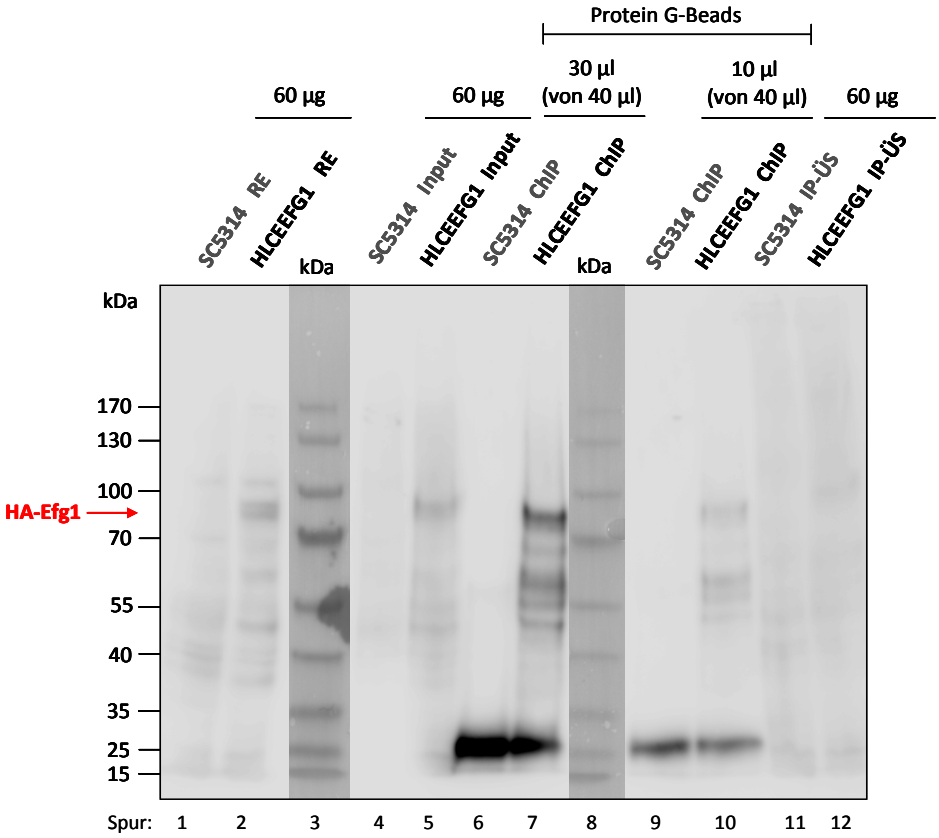


Abb. 3.18: Immunoblot-Analyse zur Überprüfung der Antikörper-Spezifität im ChIP-Experiment. Der Stamm HLCEEFG1 (HA-Efg1) und der Kontroll-Stamm SC5314 (Efg1) wurden in YPD (50 ml) bei 30 °C bis zu einer OD_{600} = 1 in der Hefeform angezogen. Protein-DNA-Interaktionen wurden durch eine Behandlung mit Formaldehyd fixiert. Das isolierte, mittels Sonifikation fragmentierte Chromatin wurde mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen (IP-ÜS; Spur 11 und 12) und das Immunpräzipitat nach mehreren Waschschritten in 40 µl 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 95 °C wurden die ChIP-Proben (30 µl bzw. 10 µl) in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und in einem Anti-HA-Immunoblot analysiert. Als Kontrollen wurden HLCEEFG1 (HA-Efg1)- und SC5314 (Efg1)-Proteinrohextrakte (RE; 60 µg), Input-Chromatin (ca. 60 µg) und die Überstände nach erfolgter Immunpräzipitation (IP-ÜS) beider Stämme aufgetragen. Die Laufhöhe von HA-Efg1 (ca. 83-88 kDa) ist durch einem roten Pfeil gekennzeichnet. Primärantikörper: Anti-HA; 1 : 2000. Sekundärantikörper: Anti-Ratte, Peroxidase-konjugiert; 1: 12000.

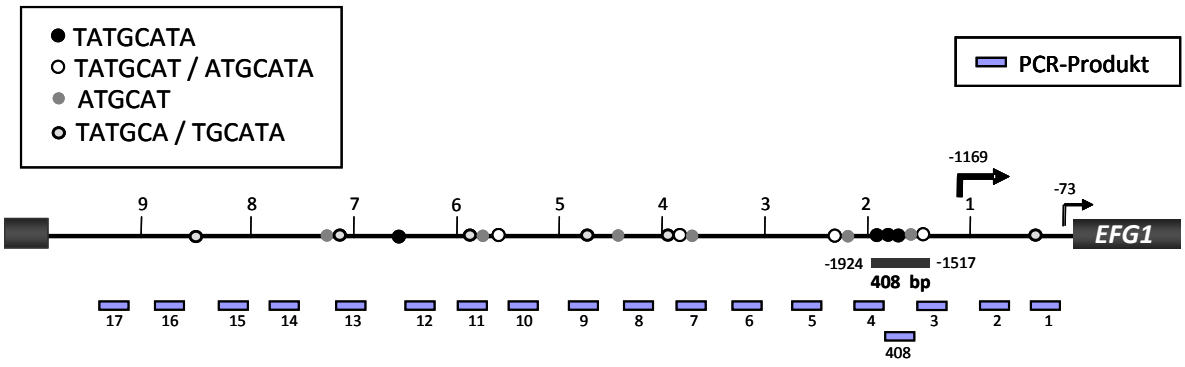
Die Ergebnisse der Immunoblot-Analyse zeigen, dass HA-Efg1 im Rahmen der Chromatinimmunpräzipitation mit dem verwendeten Anti-HA-Antikörper spezifisch immunpräzipitiert wird.

3.7.2 ChIP-Analyse zur Bindung von Efg1 an die Stromaufwärtsregion von *EFG1*

Um die Bindung von Efg1 an seinen Promotor zu untersuchen, wurden ChIP-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Stämme HLCEEFG1 (HA-Efg1) und SC5314 (Efg1) in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{600} = 1 in der Hefeform angezogen. Alle bestehenden Protein-DNA-, aber auch Protein-Protein-Interaktionen zu diesem Zeitpunkt wurden durch eine Formaldehyd-Inkubation reversibel quervernetzt. Das Chromatin wurde isoliert und 17 Mal für jeweils 30 Sekunden sonifiziert, so dass Chromatinfragmente mit einer Durchschnittsgröße von etwa 500 bp entstanden. Die Sonifizierungseffizenz wurde dabei in Vorversuchen durch eine unterschiedliche Anzahl an Sonifizierungswiederholungen ermittelt. In der Arbeit von Doedt (2003), in welcher eine Bindung von Efg1 nah am Transkriptionsstartpunkt von *EFG1* gezeigt werden konnte, wurde das Chromatin lediglich drei Mal für 12 Sekunden sonifiziert, was in den Vorversuchen dieser Arbeit mindestens doppelt so große Durchschnittsfragmente zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Darauf wurden die Chromatin-Fragmente mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert, wobei ein kleiner Teil vor der Immunpräzipitation als spätere Kontrolle (Input) entnommen wurde. Die Quervernetzungen der IP- und Input-Proben wurden aufgehoben und die Proteine verdaut. Die DNA-Fragment-Proben wurden mittels PCR mit verschiedenen *EFG1*-Promotor-spezifischen Primerpaaren analysiert. In Abb. 3.19 (A) ist eine Übersicht zur Lokalisation der verwendeten Primerpaare bzw. zu deren PCR-Produkten entlang der intergenen Region zwischen *EFG1* und dem nächsten Stromaufwärts-ORF (tG(GCC)1/tRNA-Gly) dargestellt. Die PCR-Reaktionen wurden dabei sowohl mit der immunpräzipitierten DNA (ChIP) als auch mit der DNA vor der Immunpräzipitation (Input) durchgeführt. Durch Letzteres sollte gezeigt werden, dass die DNA-Fragmente in beiden Stämmen in einem etwa gleichen Verhältnis vorhanden waren.

Die Ergebnisse in Abb. 3.19 (B) zeigen eine deutliche Anreicherung immunpräzipitierter DNA-Fragmente entsprechend der 408 bp-Region des *EFG1*-Promotors (PCR-Produkt: 3; 408; 4). Dies bestätigt die *in vitro*-Gelretardierungsergebnisse zur Bindung von Efg1 an die 408 bp-*EFG1*-Promotorregion (Bußmann, 2006; Kurtz, 2010) somit auch *in vivo.* Der Efg1-Bindebereich lässt sich jedoch nicht genauer zuordnen, da auch etwas weiter stromab- (PCR: 3) und insbesondere stromaufwärts (PCR: 4; 5) der 408 bp-Region Anreicherungen auftreten.

(A)



(B)

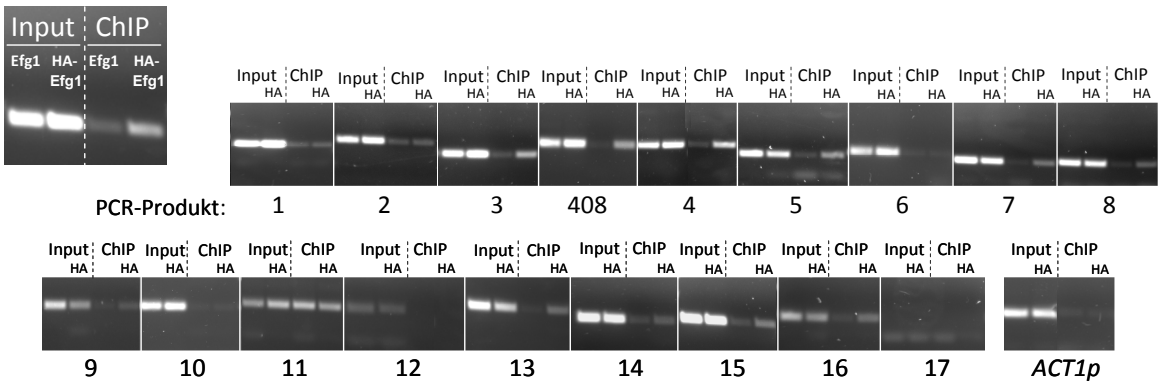


Abb. 3.19: Exemplarische Darstellung einer ChIP-Analyse zur Bindung von Efg1 an den *EFG1*-Promotor. Der HA-Efg1 produzierende Stamm HLCEEFG1 und der Kontroll-Stamm SC5314 ohne HA-Epitop wurden in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{600} = 1 in der Hefeform angezogen. Protein-DNA-Interaktionen wurden durch eine Behandlung mit Formaldehyd fixiert. Das isolierte, mittels Sonifikation fragmentierte Chromatin wurde mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. **(A)** Schematisch dargestellt sind die Positionen der verwendeten Primerpaare bzw. die resultierenden PCR-Produkte (1-17, 408) stromaufwärts von *EFG1*. **(B)** Gezeigt ist eine gelelekrophoretische Auftrennung der PCR-Analysen mit DNA-Fragment-Proben vor (Input) und nach (ChIP) der Immunpräzipitation. Die Amplifikation einer *ACT1*-Promotorregion diente als zusätzliche Kontrolle. Efg1 = Stamm SC5314; HA-Efg1 bzw. HA = Stamm HLCEEFG1. Das Primerpaar/PCR-Produkt 17 war nicht funktionell.

Es scheint, dass Efg1 an mehrere *EFG1*-Promotor-Positionen bindet, da auch mehrere Kilobasen stromaufwärts der 408 bp-Region PCR-Anreicherungen (z. B. PCR-Produkt: 13) vorkommen. Auch bei weiteren Wiederholungen des ChIP-Experiments kristallisierte sich der 408 bp-Bereich als konstante Efg1-Binderegion heraus, wobei die weiter stromaufwärts gelegenen Promotorregionen in der Fragmentanreicherung einigen leichten Schwankungen unterlagen; jedoch konnten auch hier potentielle Efg1-Interaktionen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.8 Genomweite Zielsequenzen von Efg1

Im vorigen Abschnitt konnte durch ChIP-Analysen bestätigt werden, dass Efg1 an die 408 bp-Region seines Promotors *in vivo* bindet. Des Weiteren wurde aufgrund der ChIP-Resultate und der *EFG1p*-Deletionsanalysen vermutet, dass diese Region nicht die einzige Efg1-Bindestelle innerhalb des *EFG1*-Promotors ist, sondern vermutlich mehrere Positionen stromaufwärts von der 408 bp-Region von Efg1 gebunden werden und an der Promotor-Regulation beteiligt sein könnten. In diesem Teil der Arbeit sollten ChIP-chip-Analysen durchgeführt werden, um zum einen die Bindung des Transkriptionsfaktors Efg1 an seinen eigenen Promotor zu verifizieren und dessen Binderegion(en) womöglich näher einzugrenzen. Andererseits sollten genomweit weitere Efg1-Interaktionen mit der chromosomalen DNA bzw. neue Efg1-Targets - auch in Abhängigkeit unterschiedlicher Wachstumsbedingungen - identifiziert werden.

3.8.1 ChIP-chip-Analysen zur Bindung von Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen

3.8.1.1 Efg1-Bindung an den *EFG1*- und den *TCC1*-Promotor

Für die ChIP-chip-Analysen wurde erneut der Stamm HLCEEFG1, welcher HA-Epitop markiertes (N-terminal) Efg1 vom nativen Lokus synthetisiert, in YPD-Medium bei 30 °C in der Hefeform angezogen. Als Hintergrund-Kontrolle diente der parallel angezogene Stamm DSC11 oder SC5314 ohne eine Epitop-Markierung des *EFG1.* Die anschließende Formaldehyd-Fixierung und Anti-HA-Immunpräzipitation erfolgten wie in Abschnitt 3.7.2 beschrieben. Darauf wurden die IP (Immunpräzipitat)-DNA und die DNA der Kontroll-Probe unterschiedlich fluoreszenzmarkiert (Cy5 bzw. Cy3) und auf einem *Whole-Genome-Tiling*-Array, auf dem Oligonukleotidsequenzen des gesamten *C. albicans*-Genoms präsent waren, kohybridisiert. Die Hybridisierungssignale, d. h. jeweils der Quotient aus IP-Signal (HLCEEFG1) durch das Kontroll-Signal (DSC11 oder SC5314) einer jeden Position auf dem Array, sind - nach einer Korrektur der Fluoreszenzsignalintensitäten - als sogenannte scaled $\log_2$-ratio-Werte dargestellt. Werte größer Null bedeuten ein stärkeres Fluoreszenzsignal bzw. eine stärkere DNA-Anreicherung an der entsprechenden chromosomalen Position in der IP-Probe (HLCEEFG1; HA-Efg1) im Verhältnis zur Kontrolle (DSC11/SC5314; Efg1). Die ChIP-chip-Analyse wurde im Triplikat mit jeweils unabhängigen Kulturen durchgeführt. Statistisch signifikante HA-Efg1-Binderegionen sind als Peaks dargestellt, welche eine ihrem FDR (false discovery rate)-Wert entsprechende farbliche Kodierung aufweisen (rot, FDR ≤ 0,05; orange, FDR ≤ 0,1; gelb, FDR = 0,1 - 0,2; grau, FDR > 0.2). Bei der Datenanalyse wurde das Hauptaugenmerk auf die roten Peaks mit einem FDR-Wert ≤ 0,05 gelegt, da diese identifizierten Binde-Peaks die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle darstellen. Graue Peaks wurden aufgrund ihrer höheren FDR-Werte (> 0.2) vernachlässigt, da hier das Vorhandensein eines tatsächlichen Efg1-Binde-Peaks nicht sehr wahrscheinlich ist. Eine genomweite Übersicht aller Efg1-Bindepeaks in der Hefewuchsform ist in Abb. 3.20 exemplarisch für ein ChIP-chip-Experiment gezeigt. Signifikante Efg1-Binderegionen (FDR ≤ 0,05), die in allen drei (oder in zwei) ChIP-chip-Replikaten übereinstimmen, sind in der Anhang-Tabelle 9.1 aufgelistet.

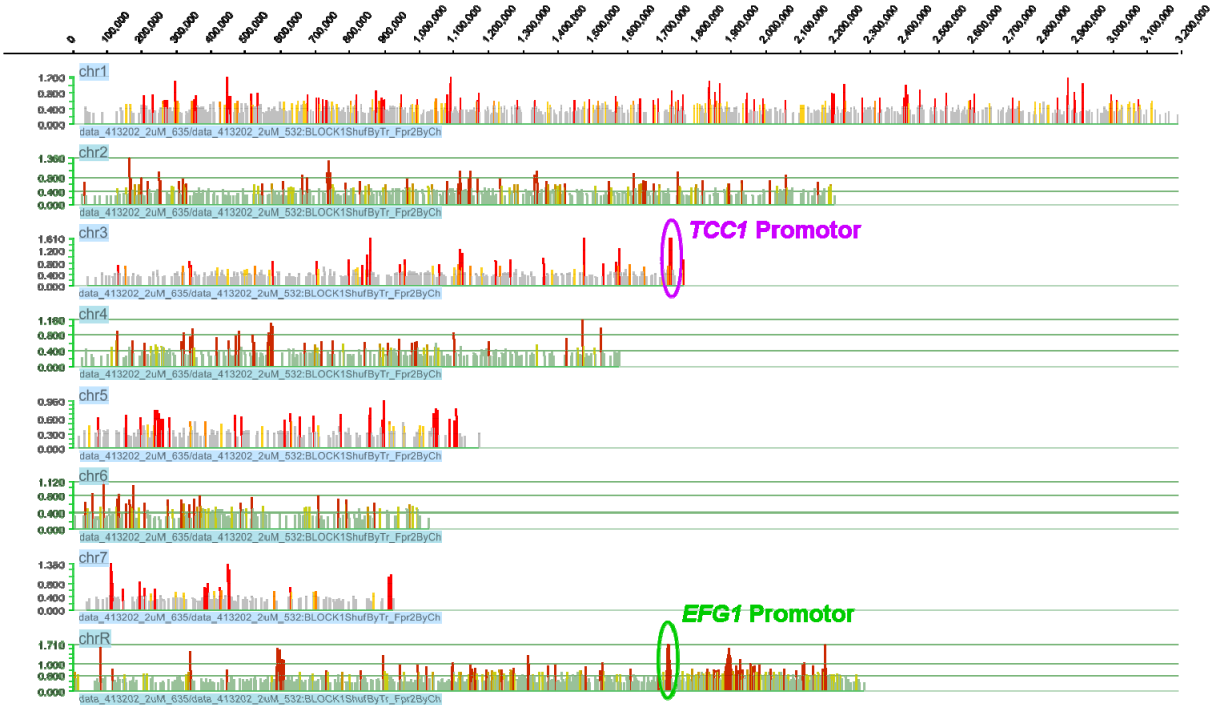


Abb. 3.20: Exemplarische genomweite Übersicht zur Bindung von Efg1 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* in der Hefewuchsform. Der Stamm HLCEEFG1 (HA-Efg1) und der Kontroll-Stamm DSC11 (Efg1) wurden in YPD-Medium bei 30 °C in der Hefeform bis zu einer OD_{600} = 1 angezogen. Protein-DNA-Interaktionen wurden durch die Zugabe von Formaldehyd fixiert. Nach Sonifikation des isolierten Chromatins wurden die HA-Efg1 gebundenen Fragmente mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die DNA-Proben beider Stämme wurden Cy5- bzw. Cy3-fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans*-Genom-Tiling-Microarray kohybridisiert. Der Stamm DSC11 ohne HA-Epitop diente zur Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz-Werte jeder Position auf dem Array. Dargestellt sind signifikante Efg1-Binderegionen, welche entsprechend ihrer Signifikanz unterschiedlich farblich gekennzeichnet sind. Rote Peaks weisen die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle auf, während graue Peaks die niedrigste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle repräsentieren; Signifikanzstufen: rot, FDR ≤ 0,05; orange, FDR ≤ 0,1; gelb, FDR = 0,1 - 0,2; grau, FDR > 0,2. Markiert sind die Positionen von *EFG1* und *TCC1* auf dem Chr R bzw. dem Chr 3.

Auf allen acht Chromosomen des *C. albicans*-Genoms wurden Efg1-Bindestellen identifiziert, wobei die Stromaufwärts-Region von *EFG1* auf dem Chromosom R zu einer von zwei Hauptzielsequenzen genomweit zählte, da hier mitunter die höchsten Binde-Peaks ermittelt wurden. Wie in Abb. 3.21 zu sehen ist, existieren mehrere Efg1-Bindestellen stromaufwärts von *EFG1* (vergl. auch Abb. 3.25, Hefewachstum). In den ChIP-chip-Replikaten 1 und 2 korrelieren die zwei höchsten Peaks zum einen mit der EGR-Boxen enthaltenden 408 bp-*EFG1*-Promotorregion und zum anderen mit einem weiter stromaufwärts gelegenen Bereich (ca. -6,5 kb bis -7,5 kb vom *EFG1*-ATG), welcher ebenfalls eine EGR-Box enthält. Das ChIP-chip-Replikat 3 zeigt den gesamten fast 10 kb großen intergenen Bereich zwischen dem *EFG1*-ORF und dem nächsten 5´-ORF als Efg1-Binderegion auf und bestätigt eine vielfache Besetzung des *EFG1*-Promotors mit dem Transkriptionsfaktor unter Hefe-wachstumsbedingungen. Des Weiteren sind auch signifikante, rote Peaks direkt stromabwärts des *EFG1*-ORFs innerhalb oder nah der 3´-UTR lokalisiert (insbesondere bei Replikat 2 und 3, Abb. 3.21). Efg1 könnte somit auch durch Bindung an seine 3´-UTR

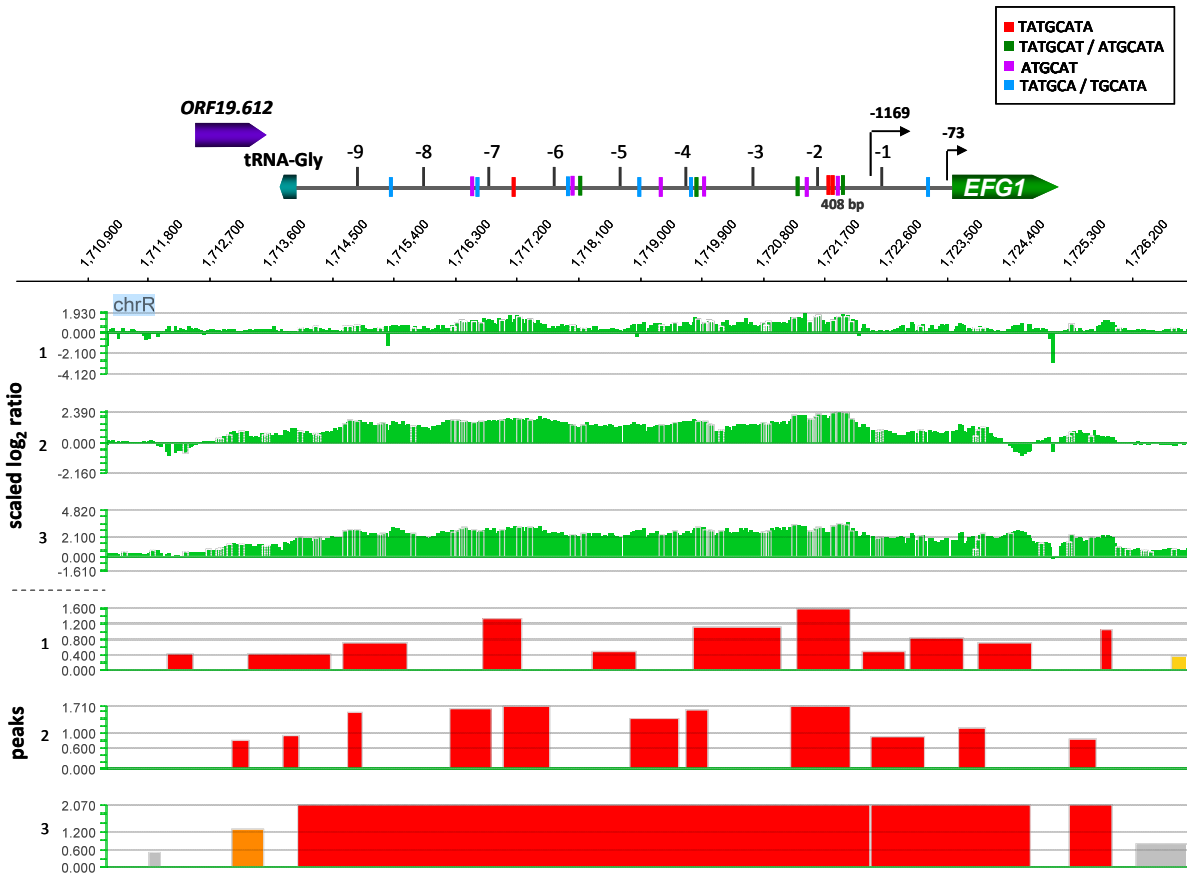


Abb. 3.21: Bindung von Efg1 an den *EFG1*-Promotor unter Hefewachstumsbedingungen. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.20 beschrieben. Dargestellt sind die Triplikat-ChIP-chip-Ergebnisse (1, 2, 3) des genomischen Abschnitts auf dem Chromosom R, auf welchem *EFG1* lokalisiert ist. Zu sehen sind die skalierten log_2-ratio-Werte [Verhältnis der Signalintensität der IP-Probe (HLCEEFG1; HA-Efg1) zu der der Kontrollprobe (DSC11; Efg1)] und die ermittelten Signifikanz-Peaks. Rote Peaks weisen dabei die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle auf, während graue Peaks die niedrigste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle repräsentieren. Die ORF-Orientierung wird durch eine Pfeilspitze angezeigt. TATGCATA-Sequenzen (EGR-Box) sind durch rote Striche gekennzeichnet, EGR-ähnliche Sequenzen sind durch grüne (TATGCAT/ATGCATA), lila (ATGCAT) oder blaue (TATGCA/TGCATA) Striche markiert. *EFG1*-Transkriptionsstartpunkte sind durch einen Pfeil und die entsprechende Position in bp relativ zum Translationsstart gezeigt. Die *EFG1*-Stromaufwärtsregion ist in kb unterteilt.

regulatorisch wirken. Nicht auszuschließen ist, dass Efg1 an die Efg1-kodierende Sequenz (*EFG1*-ORF) selbst bindet, da auch dort rote Binde-Peaks auftreten, jedoch zählen sie bezogen auf die gesamte *EFG1*-Region inklusive dem Promotorbereich zu den eher niedrigeren roten Peaks.

Die zweite identifizierte Efg1-Hauptzielregion liegt auf dem Chromosom 3 und stellt die Stromaufwärtssequenz von *TCC1* dar. Im Gegensatz zur Efg1-Bindung an den *EFG1*-Promotor existierten hier keine vorangegangenen Indizien für eine Bindung von Efg1. *TCC1* (*ORF19.6734*) kodiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher als Repressor der Hypenbildung in *C. albicans* eine Rolle spielt (Kaneko *et al.*, 2006). Die Disruption des *TCC1*-Gens führt zum pseudohyphalen Wachstum von *C. albicans* unter Hefewachstumsbedingungen und äußert sich zudem in einer verminderten Virulenz im

Tiermodell. Es wurde gezeigt, dass Tcc1 (Tup1 complex component) mit Tup1, einem weiteren Repressor der Hyphenbildung, interagiert. Tcc1 und Tup1 regulieren allgemeine hypenspezifische Gene negativ (Kaneko *et al*., 2006). In Abb. 3.22 sind die Efg1-Bindestellen innerhalb der fast 9 kb großen *TCC1*-Stromaufwärtsregion dargestellt. Auffällig sind zwei herausragende Peaks, welche in allen drei biologischen Replikaten (ChIP-chip 1, 2, 3) auftreten. Interessanterweise korreliert der Efg1-Bindepeak bei ca. -0,9 kb bis -3 kb

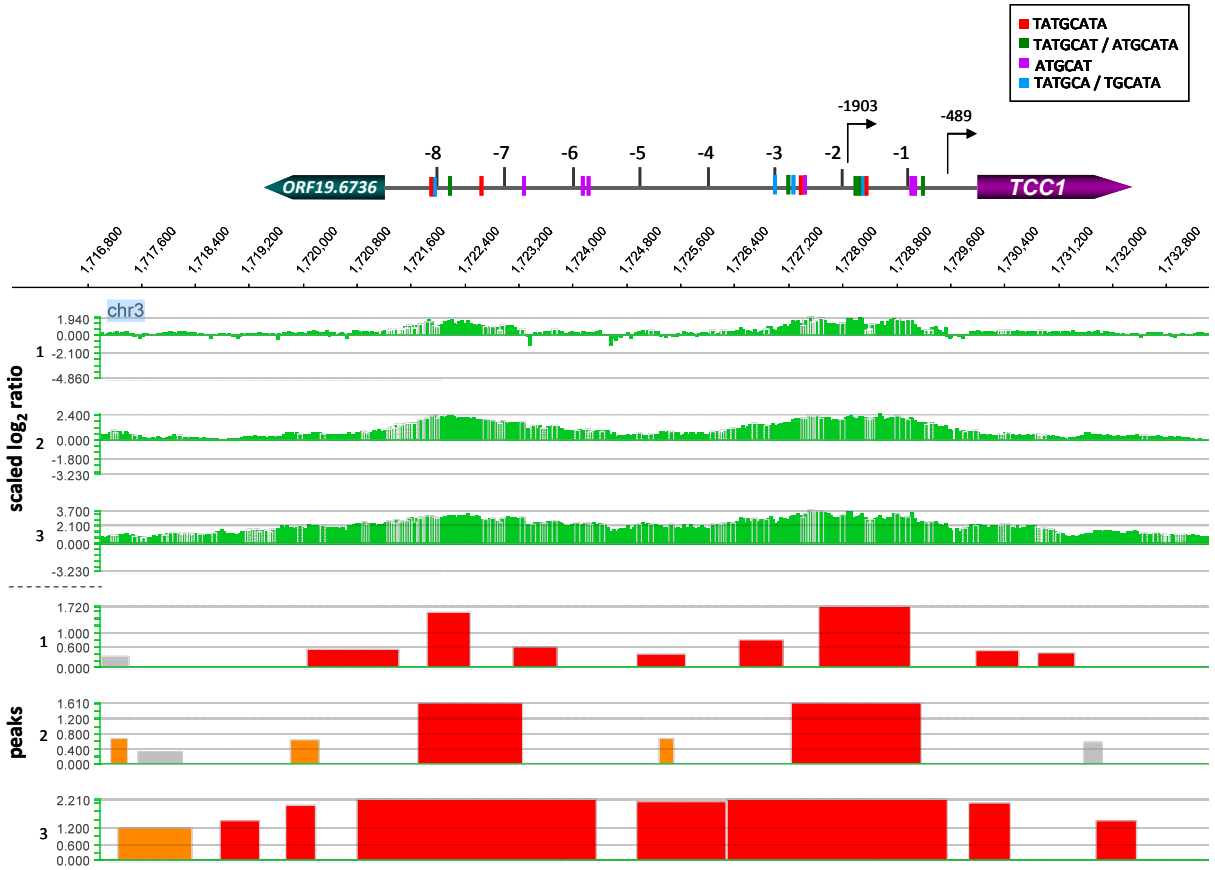


Abb. 3.22: Bindung von Efg1 an den *TCC1*-Promotor unter Hefewachstumsbedingungen. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.20 beschrieben. Dargestellt sind die Triplikat-ChIP-chip-Ergebnisse (1, 2, 3) des genomischen Abschnitts auf dem Chromosom 3, auf welchem *TCC1* lokalisiert ist. Zu sehen sind die skalierten log_2-ratio-Werte [Verhältnis der Signalintensität der IP-Probe (HLCEEFG1; HA-Efg1) zu der der Kontrollprobe (DSC11; Efg1)] und die ermittelten Signifikanz-Peaks. Rote Peaks weisen dabei die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle auf, während graue Peaks die niedrigste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle darstellen. Die ORF-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. TATGCATA-Sequenzen (EGR-Box) werden durch rote Striche repräsentiert, EGR-ähnliche Sequenzen sind durch grüne (TATGCAT/ATGCATA), lila (ATGCAT) oder blaue (TATGCA/TGCATA) Striche markiert. Transkriptionsstartpunkte sind durch einen Pfeil und die entsprechende Position in bp relativ zum Translationsstart gezeigt. Die *TCC1*-Stromaufwärtsregion ist in kb unterteilt.

stromaufwärts des ATG mit einer *TCC1*-Promotorregion, welche eine Akkumulation von EGR- bzw. EGR-ähnlichen Sequenzen aufweist. Zudem beinhaltet diese Region auch den Transkriptionsstartpunkt für ein langes *TCC1*-Transkript bei ca. -1,9 kb vom Translationsstart.

Ein zweiter Transkriptionsstart für ein kürzeres *TCC1*-Transkript ist bei -489 bp positioniert, jedoch liegt hier keine eindeutige Efg1-Bindung unter den gestesteten Bedingungen vor. Das Vorhandensein zweier Transkriptionsstartpunkte stellt eine Parallele zu *EFG1* dar, bei welchem auch ein langes *EFG1*-Haupttranskript und ein deutlich kürzeres zweites *EFG1*-Nebentranskript bekannt sind (Abb. 3.21; Tebarth *et al.,* 2003). Der zweite Efg1-Bindepeak befindet sich ca. 7 - 8,2 kb stromaufwärts vom *TCC1*-ORF. Auch in dieser Region ist wieder eine Ansammlung mehrerer potentieller EGR-(ähnlicher) Motive auffällig. Es ist gut möglich, dass dieser zweite Efg1-Bindepeak aufgrund der Entfernung eher dem *ORF19.6736* zuzuordnen ist, welcher den nächsten 5´-ORF von *TCC1* darstellt und zum *TCC1*-ORF entgegengesetzt orientiert ist. Die molekulare Funktion des durch den *ORF19.6736* kodierten Proteins ist in *C. albicans* unbekannt. Das orthologe Protein Gep3 in *S. cerevisiae* ist in den Mitochondrien lokalisiert, jedoch ist die genaue Funktion auch hier unklar.
Es kann festgehalten werden, dass der *EFG1*-Promotor und der als neues Target identifizierte *TCC1*-Promotor unter Hefewachstumsbedingungen durch Efg1 gebunden werden, wobei die Binderegionen mit allen vorhandenen EGR-Motiven (TATGCATA) korrelieren und zudem eine Anhäufung EGR-ähnlicher Sequenzen aufweisen.

3.8.1.2 Genomweite Zielsequenzen von Efg1 während des Hefewachstums

Die genomweiten ChIP-chip-Analysen ergaben, dass 92 % der Efg1-Bindestellen unter Hefewachstumsbedingungen außerhalb von ORF-Sequenzen lokalisiert sind. Mit Hilfe des Gen-Ontologie (GO)-Analyseprogramms (CGD Gene Ontology Term Finder; http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder) kann nach signifikanten gemeinsamen Kategorien eines Gensets gesucht werden. Hierzu wurden die 53 identifizierten Gene, welche eine Efg1-Bindestelle in ihrer Stromaufwärts-Region unter Hefewachstumsbedingungen aufwiesen (enthalten in Anhang-Tabelle 9.1), nach ihrem „biologischen Prozess“ und ihrer „molekularen Funktion“ analysiert. Während 30 Gene noch nicht charakterisiert worden sind und keiner GO-Kategorie zugewiesen werden konnten, wurden 23 Gene in die Kategorien der beiden Hauptklassen „biologischer Prozess“ (23 Gene) und „molekulare Funktion“ (11 Gene) eingruppiert (Tab. 3.1). Darunter wurden viele bereits bekannte Gene identifiziert, die in die Regulation der Hyphenbildung (z. B. *CZF1, DEF1, EFG1, FGR17, NRG1, RFG1, RHB1, TCC1, TEC1, WOR2, CPP1*) oder des *white-opaque*-Phänotypwechsels (*CZF1, EFG1, WOR1, WOR2*) involviert sind. In beiden Fällen handelt es sich dabei sowohl um induzierende (Czf1, Efg1, Fgr17, Tec1, Wor1, Wor2) als auch um reprimierende (Efg1, Nrg1, Rfg1, Tcc1) Regulatoren. Efg1 tritt in beiden Gruppierungen auf, da gezeigt wurde, dass Efg1 unter normoxischen Bedingungen als Aktivator der Hyphenbildung agiert, aber unter Hypoxie als Repressor wirkt (Setiadi *et al.,* 2006). Viele der Gene mit deren Promotor-Region Efg1 interagiert, kodieren selbst auch für Transkriptionsfaktoren, wie z. B. *NRG1, RFG1, TEC1, WOR1 und WOR2*. So liegt es nahe, dass Efg1 als allgemeiner Schlüssel-Regulator die zahlreichen in Transkriptom-Studien als Efg1-reguliert identifizierten Gene (Doedt *et al.,* 2004; Setiadi *et al.,* 2006) sehr wahrscheinlich indirekt über Zwischenmediatoren steuert.

Tab. 3.1: Gen-Ontologie (GO)-Zuordnung der relativ zu den Efg1-Binderegionen nächsten Stromabwärtsgene in der Hefewuchsform.

GO-Überkategorie	GO-Kategorie	Gene
Biologischer Prozess	filamentöses Wachstum Zellwachstum	*AAF1, CPP1, CUP9, CZF1, DEF1, EFG1, FGR17, NRG1, RFG1, RHB1, SHA3, TCC1, TEC1, WOR2, ORF19.4459*
	Regulation zellulärer makromolekularer biosynthetischer Prozesse Regulation makromolekularer biosynthetischer Prozesse Regulation zellulärer biosynthetischer Prozesse Regulation makromolekularer metabolischer Prozesse Regulation primärer metabolischer Prozesse	*AAF1, CBF1, CRZ2, CUP9, CZF1, EFG1, FGR17, HAP41, NRG1, RFG1, SBP1, SHA3, TCC1, TEC1, WOR1, WOR2, ORF19.3302*
	Regulation der Zelldifferenzierung	*CZF1, EFG1, WOR1, WOR2*
	Regulation der Transkription, DNA-abhängig Regulation des RNA-Metabolismus	*AAF1, CBF1, CRZ2, CUP9, CZF1, EFG1, FGR17, HAP41, NRG1, RFG1, SHA3, TCC1, TEC1, WOR1, WOR2*
	Regulation der Genexpression	*AAF1, CBF1, CRZ2, CUP9, CZF1, EFG1, FGR17, HAP41, NRG1, RFG1, SBP1, SHA3, TCC1, TEC1, WOR1, WOR2*
	Zelladhäsion	*AAF1, DEF1, EFG1, TEC1, WOR1*
Molekulare Funktion	Transkriptionsfaktor-Aktivität; Nukleinsäurebindung Transkriptionsfaktor-Aktivität; Sequenz-spezifische DNA-Bindung	*CBF1, CRZ2, CUP9, CZF1, EFG1, FGR17, NRG1, RFG1, TEC1, WOR1, WOR2*

Basierend auf den ChIP-chip-Analysen unter Hefewachstumsbedingungen wurden 53 Gene identifiziert, welche in ihrem Promotorbereich eine signifikante Efg1-Bindung aufwiesen; 23 dieser Gene konnten mit Hilfe des „GO Term Finder"-Programms (http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder) gemeinsamen signifikanten Kategorien (p-value ≤ 0,1) zugeordnet werden. Der FDR-Wert aller aufgelisteten GO-Kategorien beträgt 0 %.

3.8.1.3 Analyse zur Efg1-Konsensus-Bindesequenz

Um zu klären, ob die EGR-Box (TATGCATA) und/oder deren Derivate (TATGCAT/ATGCATA, ATGCAT, TATGC/GCATA) als allgemeine Efg1-Bindemotive fungieren könnten, wurden die mittels ChIP-chip ermittelten 69 signifikanten Efg1-Binderegionen (235 bp bis 4358 bp lang; Anhang-Tab. 9.1, Hefewuchsform) auf gemeinsame Motive untersucht. Dazu wurde das

„RSAT dyad-analysis (spaced pairs)“-Programm (http://rsat.ulb.ac.be/; van Helden, 2003) genutzt, mit welchem signifikante überrepräsentierte Trinukleotidpaar (dyads)-Sequenzen identifiziert wurden. Diese wurden anschließend zu Nukleotidverteilungs-Matrizen (*count matrices*, *position-specific scoring matrices*, PSSM) konvertiert, welche die vorausgesagten Konsensussequenzen für Efg1 repräsentieren (Abb. 3.23). Wie aus der Rang-Tabelle (Abb. 3.23, links) hervorgeht, wurde an erster Position das Motiv TATGCA (bzw. TGCATA) und an dritter Stelle das Motiv ATGCAT gefunden. Die Überschneidung dieser Sequenzen ergibt das EGR-Palindrom TATGCATA, welches als erstbeste Efg1-Konsensussequenz ermittelt wurde (Abb 3.23, rechts). Die 8 bp-Konsensussequenz weist keine Variabilität in ihrer Basenabfolge auf und wird zudem oft durch zwei A/T-Nukleotide flankiert. Wie schon in Abschnitt 3.8.1.1 festgestellt wurde, korrelierte die HA-Efg1-Bindung innerhalb des *EFG1*- und *TCC1*-Promotors mit allen vollständigen TATGCATA-8 bp-Motiven.
Basierend auf den vorangegangenen *in vitro* EMSA- und Footprint-Untersuchungen, den in dieser Arbeit gezeigten *in vivo* ChIP- und ChIP-chip-Resultaten und der RSAT-Motiv-Analyse wird der Schluss gezogen, dass das EGR (Efg1-recognition)-Motiv TATGCATA sehr wahrscheinlich die Erkennungssequenz für den Transkriptionsregulator Efg1 darstellt.

Hefeform

Rang	Sequenz	p-value	E-value
1	tatn{0}gca	1.1e-20	4.7e-16
2	aagn{0}aaa	1.4e-20	6.2e-16
3	atgn{0}cat	6.2e-20	2.7e-15
4	agan{0}aaa	3.8e-17	1.6e-12
5	cacn{3}cac	2.7e-16	1.2e-11

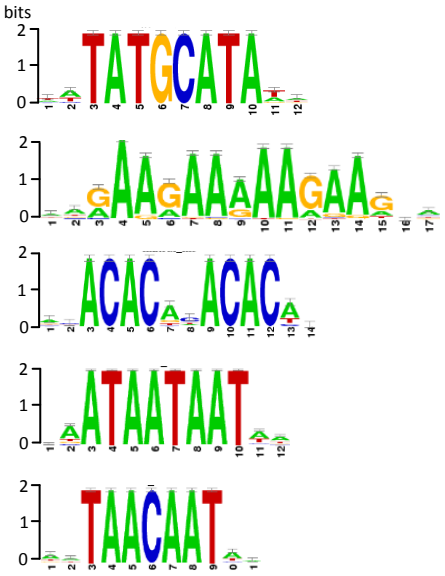


Abb. 3.23: Vorhersage von Efg1-Bindeelementen in der Hefewuchsform von *C. albicans*. Das Programm „RSAT-dyad analysis“ (van Helden, 2003) wurde benutzt, um Efg1-Erkennungssequenzen innerhalb der 69 identifizierten signifikanten Efg1-Bindepeakregionen während des Hefewachstums zu detektieren. Links dargestellt ist eine tabellarische Rangordnung überrepräsentierter Trinukleotidpaare (dyads) und die dazugehörigen p- und E-Werte; Dyad-abgeleitete Nukleotidverteilungs-Matrizen sind rechts daneben abgebildet und zeigen die vorausgesagten Konsensussequenzen für Efg1.

Eine Genom-übergreifende Suche nach bereits bekannten EGR-ähnlichen Motiven mit Hilfe des MATCH-Programms (http://www.gene-regulation.com/cgibin/pub/programs/match/bin/match.cgi) ergab keine Ergebnisse für die Konsensussequenz TATGCATA. Unter

den vier weiteren ermittelten Efg1-Konsensussequenzen wurden die ähnlichen Motive TAAT/CAAT identifiziert, welche als Erkennungssequenzen für Homöobox-Proteine gelten (Catron *et al.*, 1993).

3.8.2 ChIP-chip-Analysen zur Bindung von Efg1 unter Hypheninduktionsbedingungen

3.8.2.1 Keine Efg1-Bindung an den *EFG1*- und den *TCC1*-Promotor 30 Minuten nach Hypheninduktion

Vergleichend zu den genomweiten Efg1-Binde-Analysen in der Hefewuchsform wurden die ChIP-chip-Analysen auch unter Hypheninduktionsbedingungen durchgeführt. Ziel war es eventuell neue Erkenntnisse bezüglich der negativen Autoregulation des *EFG1*-Promotors zu Beginn der Hyphenbildung zu gewinnen und generell Hypheninduktions-spezifische Efg1-Zielsequenzen und Zielgene zu identifizieren. Auch hier wurden wie für die Experimente unter Hefebedingungen die beiden Stämme HLCEEFG1 (HA-markiertes *EFG1*) und DSC11 (Kontrolle; ohne HA-Epitopmarkierung) im Triplikat analysiert. Die beiden Stämme wurden in YP-Medium mit 10 % Serum bei 37 °C unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen. Nach 30 Minuten erfolgte die Fixierung der Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen durch eine Behandlung der Kulturen mit Formaldehyd. 30 Minuten nach Hypheninduktion waren noch keine Hyphen ausgebildet, lediglich eine beginnende Keimschlauchentwicklung war erfolgt (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren ChIP-chip-Analyseschritte wurden wie unter Hefewachstumsbedingungen beschrieben durchgeführt (Abschnitt 3.8 oder Abb. 3.20). Eine genomweite Übersicht zu den Efg1-Bindestellen während der Hypheninduktion ist in Abb. 3.24 exemplarisch für ein ChIP-chip-Experiment dargestellt. Die Efg1-Bindepeak-Regionen (FDR ≤ 0,05), die in allen drei (oder teilweise zwei) ChIP-chip-Experimenten übereinstimmten, können der Anhang-Tabelle 9.2 entnommen werden. Es wurde ermittelt, dass anders als während des Wachstums in der Hefeform, der Großteil der HA-Efg1-Binderegionen (etwa 70 %) während der Hypheninduktion auch oder nur ORF-Sequenzen umfasst. Es wurden signifikante Efg1-Interaktionen mit DNA-Regionen aller acht Chromosomen identifiziert (Abb. 3.24), jedoch wurden keine HA-Efg1-Bindungen innerhalb der Stromaufwärts-Region von *EFG1* (Chr R) und *TCC1* (Chr 3) wie unter Hefewachstumsbedingungen detektiert (Abb. 3.25 und Abb. 3.26). Wie Abb. 3.25 zudem entnommen werden kann, sind 30 Minuten nach Hypheninduktion auch keine Efg1-Bindepeaks innerhalb des *EFG1*-ORFs oder im 3´-UTR-Bereich mehr feststellbar.

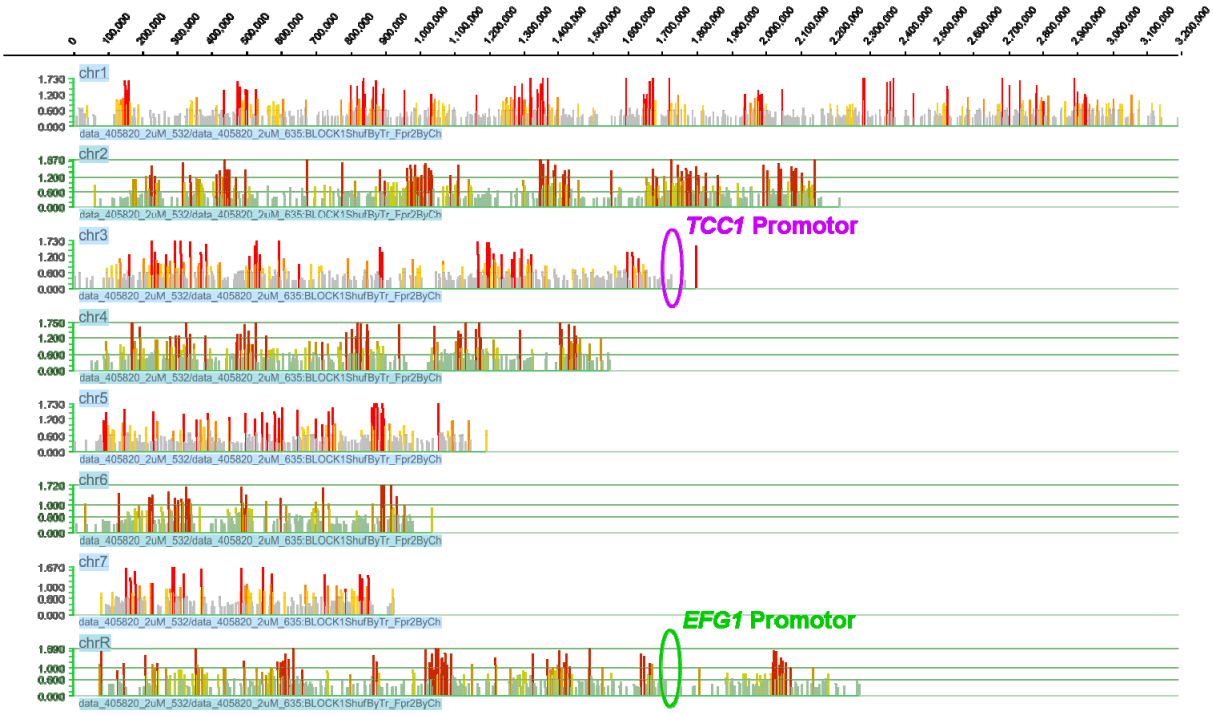


Abb. 3.24: Exemplarische genomweite Übersicht zur Bindung von Efg1 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* während der Hypheninduktion. Der Stamm HLCEEFG1 (HA-Efg1) und der Kontroll-Stamm DSC11 (Efg1) wurden in YP-Medium mit 10 % Serum für 30 Minuten bei 37 °C unter Hypheninduktionsbedingungen inkubiert. Protein-DNA-Interaktionen wurden durch die Zugabe von Formaldehyd fixiert. Nach Sonifikation des isolierten Chromatins wurden die HA-Efg1 gebundenen Fragmente mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die DNA-Proben beider Stämme wurden Cy5- bzw. Cy3-fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans*-Genom-Tiling-Microarray kohybridisiert. Der Stamm DSC11 ohne HA-Epitop diente zur Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz-Werte jeder Position auf dem Array. Dargestellt sind signifikante Efg1-Binderegionen, welche entsprechend ihrer Signifikanz unterschiedlich farblich kodiert sind. Rote Peaks weisen die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle auf, während graue Peaks mit der niedrigsten Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle einhergehen; Signifikanzstufen: rot, FDR ≤ 0,05; orange, FDR ≤ 0,1; gelb, FDR = 0,1 - 0,2; grau, FDR > 0,2. Markiert sind die Positionen von *EFG1* und *TCC1* auf dem Chr R bzw. auf dem Chr 3.

In Abb. 3.25 fällt unter Hypheninduktionsbedingungen auf, dass die scaled $\log_2$-ratio-Werte innerhalb der *EFG1*-ORF-Region und stromaufwärts vom *EFG1*-ORF bis etwa -3,5 kb (insbesondere im Fall von Replikat 2 und 3) sehr deutlich in den negativen Bereich ragen. Dieses bedeutet, dass das Fluoreszenzsignal der Kontroll-Probe (bzw. die DNA-Fragment-Anreicherung) stärker war als das Fluoreszenszignal (bzw. die DNA-Anreicherung) der Testprobe (Stamm mit HA-markiertem *EFG1*). Theoretisch würde man in der Kontrollprobe keine oder zumindest keine derart starke unspezifische Anreicherung durch die Anti-HA-Immunpräzipitation erwarten. Derartige negative Anreicherungen können im Hintergrund-Rauschen, in Sequenz-begünstigten Amplifikationen oder in systematischen Fehlern der Chip-chip-Technologie (Normierungs-Bias), die zu Verzerrungen führen können, begründet liegen (Znaidi *et al.*, 2009; Buck and Lieb, 2004). Negative Anreicherungen sind in der *TCC1*-Region hingegen nicht feststellbar (Abb. 3.26), wobei es sich um dasselbe Experiment (dieselben DNA-Proben, derselbe Microarray usw.) handelte. Daher scheint es sich im Fall von *EFG1* eher um eine spezifische lokale Erscheinung zu handeln.

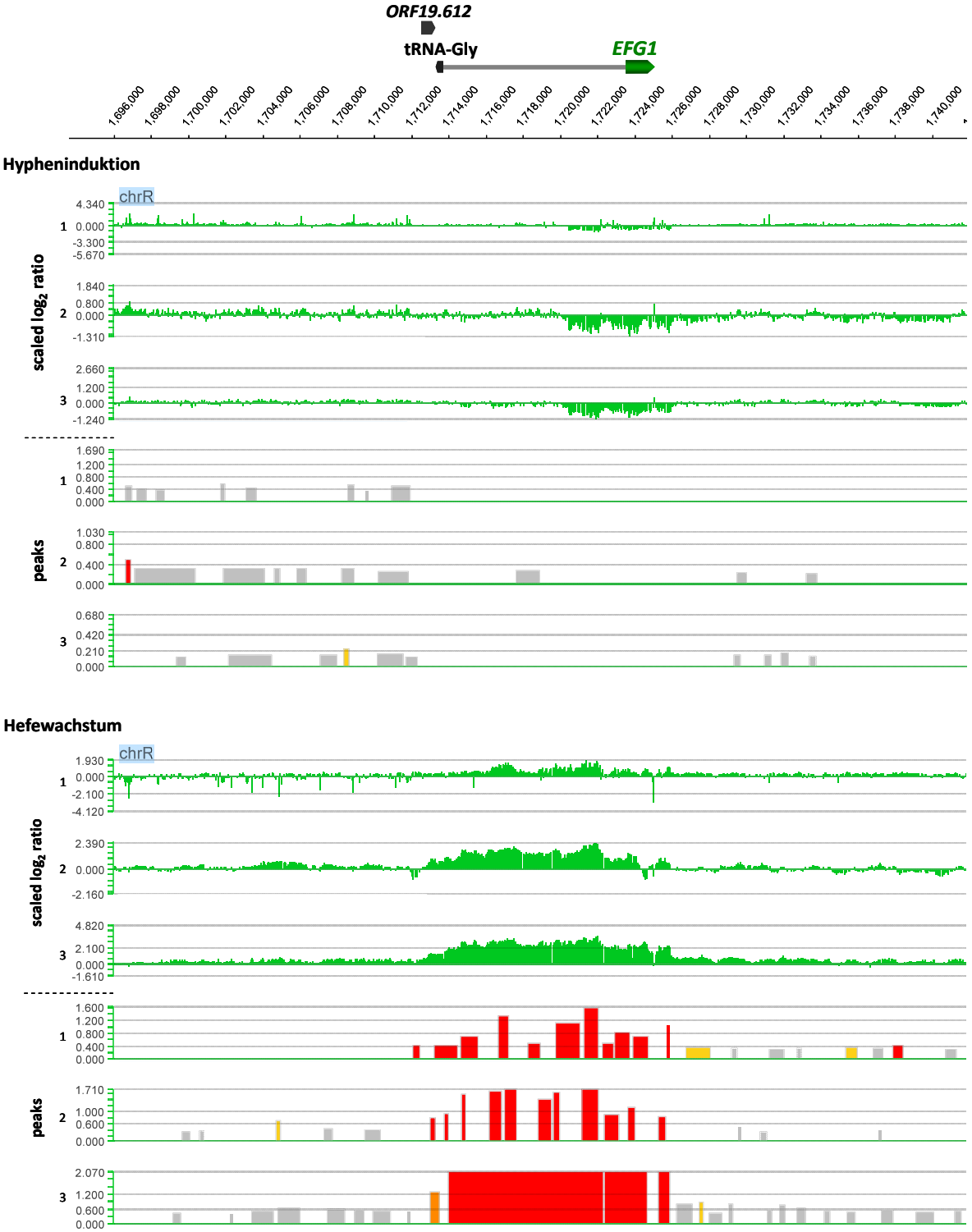


Abb. 3.25: Analyse zur Bindung von Efg1 an den *EFG1*-Promotor unter Hypheninduktionsbedingungen. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.24 beschrieben. Dargestellt sind die Triplikat-ChIP-chip-Ergebnisse (1, 2, 3) des genomischen Abschnitts auf dem Chromosom R, auf welchem *EFG1* lokalisiert ist. Zu sehen sind die skalierten log_2-ratio-Werte und die ermittelten Signifikanz-Peaks unter Hypheninduktionsbedingungen. Rote Peaks repräsentieren die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle, während graue Peaks mit der niedrigsten Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle einhergehen. Die ORF-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Zum direkten Vergleich sind auch die Triplikat-Ergebnisse der Chip-chip-Analysen unter Hefewachstumsbedingungen gezeigt.

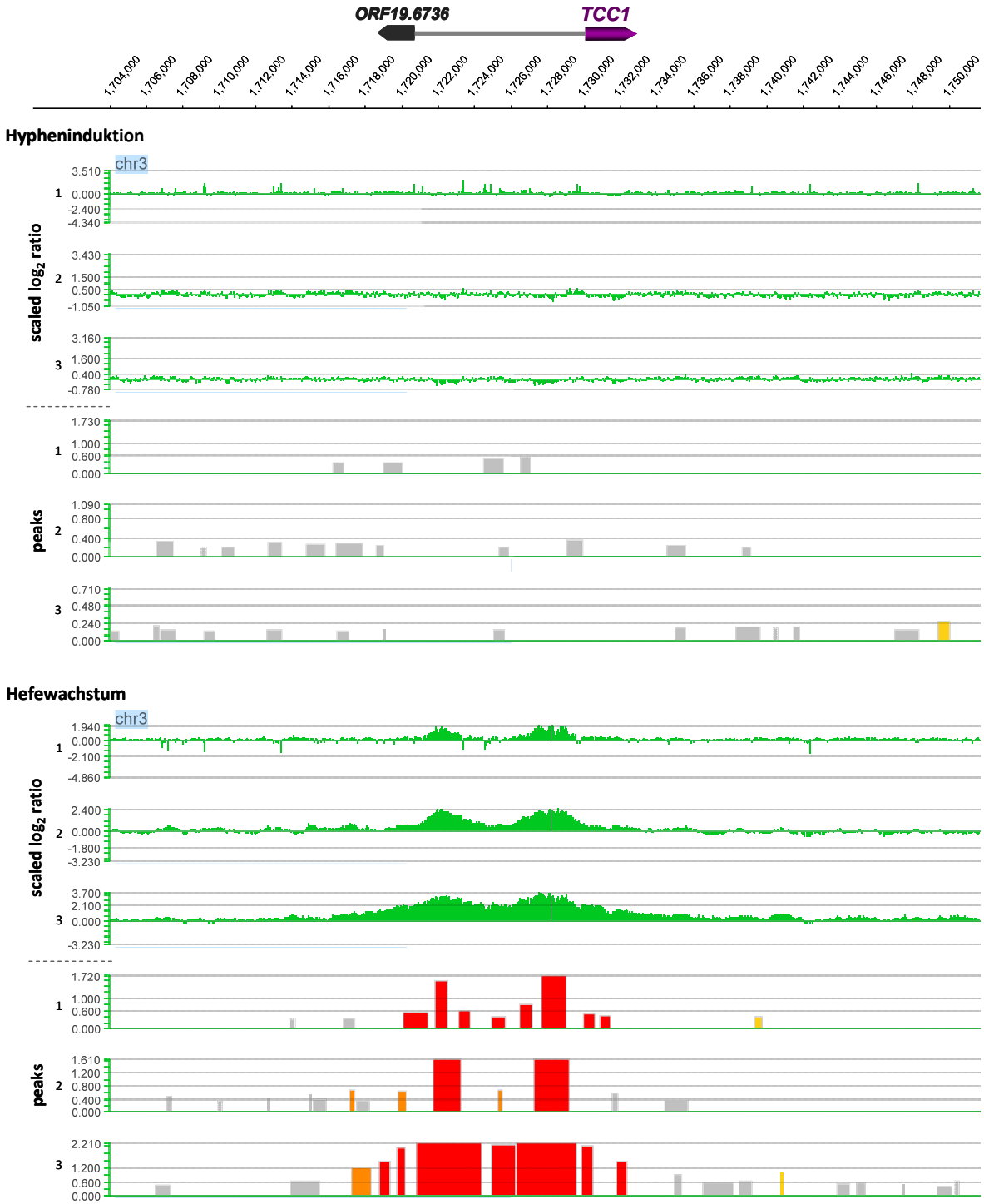


Abb. 3.26: Analyse zur Bindung von Efg1 an den *TCC1*-Promotor unter Hypheninduktionsbedingungen. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.24 beschrieben. Dargestellt sind die Triplikat-ChIP-chip-Ergebnisse (1, 2, 3) des genomischen Abschnitts auf dem Chromosom 3, auf welchem *TCC1* lokalisiert ist. Zu sehen sind die skalierten log_2-ratio-Werte und die ermittelten Signifikanz-Peaks unter Hypheninduktionsbedingungen. Rote Peaks gehen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle einher, während graue Peaks die niedrigste Wahrscheinlichkeit für eine Efg1-Bindestelle darstellen. Die ORF-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Zum direkten Vergleich sind auch die Triplikat-Ergebnisse der Chip-chip-Analysen unter Hefewachstumsbedingungen gezeigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich das Efg1-Bindemuster während der Hypheninduktion im Vergleich zum Wachstum in der Hefeform in Bezug auf *EFG1* und *TCC1* wandelt, da 30 Minuten nach Induktion keine Bindung an den *EFG1*-Promotor oder den *TCC1*-Promotor mehr vorhanden ist.

3.8.2.2 Bindung genomweiter Zielsequenzen durch Efg1 während der Hypheninduktion

Unter Hypheninduktionsbedingungen wurden bis auf sehr wenige Ausnahmen vollkommen andere Genom-Regionen innerhalb der acht *C. albicans*-Chromosomen durch HA-Efg1 gebunden als unter Hefewachstumsbedingungen (Anhang-Tabellen 9.1 und 9.2). Wie schon in Abschnitt 3.8.2.1 erwähnt, lagen dabei die Efg1-Binderegionen zu etwa 70 % innerhalb von ORF-Sequenzen, wohingegen unter Hefewachstumsbedingungen überwiegend nicht kodierende chromosomale Regionen gebunden wurden. Die Gen-Ontologie (GO)-Analyse mittels des „GO Term Finder"-Programms (http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder) erbrachte keine Ergebnisse zur Signifikanz-basierten GO-Kategorie-Eingruppierung der nächsten stromauf- und stromabwärts positionierten Gene relativ zu den Efg1-Binderegionen (Gene s. Anhang-Tabelle 9.2). Dies lässt schlussfolgern, dass Efg1 während der Hypheninduktion Gene reguliert, welche ein sehr breites funktionales Spektrum umfassen. Unter Verwendung des „GO Slim Mapper"-Programms (http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermMapper) wurde eine Signifikanz-unabhängige Einordnung der identifizierten Hyphe-Gene in allgemeinere Kategorien vorgenommen (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Funktionelle Zuordnung der relativ zur Efg1-Binderegion benachbarten 5´- und 3´-Gene der Hypheninduktions-Analyse.

GO-Slim Überkategorie	GO-Slim Kategorie	Gene
Biologischer Prozess	biologischer Prozess unbekannt (46 von 116 Genen)	*AVT7, DSL1, FRP5, GDS1, SNU114, TLO8, YAE1, ORF19.1286, ORF19.1287, ORF19.1533, ORF19.1606, ORF19.1707, ORF19.1708, ORF19.1766, ORF19.1768, ORF19.1785, ORF19.1789, ORF19.1834, ORF19.1961, ORF19.2539, ORF19.3204, ORF19.3205, ORF19.3210, ORF19.3214, ORF19.3215, ORF19.3439, ORF19.35.1, ORF19.3522, ORF19.36, ORF19.3694, ORF19.4273, ORF19.4703, ORF19.5041, ORF19.5042, ORF19.5235, ORF19.5701, ORF19.6008, ORF19.6192, ORF19.6316.4, ORF19.6456, ORF19.6491, ORF19.6493, ORF19.6607, ORF19.6608, ORF19.6861, ORF19.725*
	Transport	*ALR1, ATX1, FCY21, RCY1, VRG4, ORF19.1210, ORF19.1229, ORF19.1355, ORF19.1356, ORF19.1376, ORF19.1532, ORF19.2746, ORF19.2749, ORF19.2822, ORF19.2925, ORF19.3218, ORF19.6316, ORF19.6862, ORF19.7038*
	Filamentöses Wachstum	*ARG83, BCR1, CPH1, FGR42, FGR47, GCN4, IRO1, RAD9, RAS1, RBD1, RGT1, TUP1, UME6, URA3, VRG4, ORF19.2746*

	RNA-Metabolismus	*MET18, RPA190, TBP1, ORF19.1029, ORF19.1296, ORF19.1356, ORF19.1531, ORF19.1791, ORF19.1833, ORF19.265, ORF19.6862, ORF19.81*
	Antwort auf chemische Stimuli	*ATX1, CPH1, FCY21, KSP1, PTC2, RAS1, TUP1, ORF19.3218, ORF19.3438, ORF19.6862*
	Organisation von Organellen	*TUP1, ORF19.1532, ORF19.1767, ORF19.1791, ORF19.2822, ORF19.4557, ORF19.4629, ORF19.6455, ORF19.6862, ORF19.7038*
	Proteinmodifikation	*HEM3, KSP1, PTC2, VRG4, ORF19.1028, ORF19.1761, ORF19.1767, ORF19.4629, ORF19.6492*
	Stressantwort	*ATX1, CPH1, GCN4, MET18, PTC2, RAD9, RAS1, ORF19.3438*
	Hyphen-Wachstum	*CPH1, GCN4, RAD9, RAS1, TUP1, UME6, VRG4*
	Pathogenese	*CPH1, HEM3, IRO1, RAS1, TUP1, UME6, URA3*
	Kohlenhydrat-Metabolismus	*CPH1, RGT1, VRG4, XKS1, ORF19.1355, ORF19.1761*
	Wirtsinteraktion	*BCR1, CPH1, RAS1, TUP1, URA3*
	Ribosomen-Biogenese	*ORF19.1029, ORF19.1791, ORF19.1833, ORF19.6862, ORF19.81*
	Aminosäure-Metabolismus	*ARG83, LEU42, LYS1, MET18, PUT1*
	Antwort auf Arzneimittel	*FCY21, KSP1, TUP1, ORF19.3218, ORF19.6862*
	Signaltransduktion	*CPH1, PTC2, RAS1, ROM2, ORF19.2925*
	Interspezies-Interaktion zwischen Organismen	*BCR1, CPH1, RAS1, TUP1, URA3*
	Protein-Katabolismus	*ORF19.1028, ORF19.1767, ORF19.1993, ORF19.3438*
	Zellentwicklung	*DIT1, DIT2, RAS1, ORF19.1376*
	Biofilmbildung	*BCR1, CPH1, GCN4*
	Pseudohyphales Wachstum	*CPH1, RAS1, ORF19.2746*
	Zellwand-Organisation	*CPH1, DIT1, DIT2*
	Zellhomöostase	*ATX1, IRO1, ORF19.2746*
	DNA-Metabolismus	*MET18, TBP1, TUP1*
	Vesikel-vermittelter Transport	*RCY1, ORF19.1376, ORF19.2746*
	Proteinfaltung	*ORF19.2925, ORF19.3438*
	Zellzyklus	*ORF19.4557, ORF19.6455*
	Lipid-Metabolismus	*VRG4, ORF19.6966*
	Zytoskelett-Organisation	*ORF19.4557*
	Zelladhäsion	*TUP1*
	Zellmembran-Organisation	*RCY1*
	Transposition	*TBP1*
	keine GO-Slim Kategorie-Zuordnung	*ADE6, SAP98, SAP99, ORF19.1994, ORF19.264, ORF19.3216, ORF19.5702*
Molekulare Funktion	Molekulare Funktion unbekannt (50 von 116 Genen)	*AVT7, DSL1, FGR42, FGR47, FRP5, GDS1, IRO1, RAD9, TLO8, YAE1, ORF19.1028, ORF19.1286, ORF19.1287, ORF19.1296, ORF19.1532, ORF19.1533, ORF19.1606, ORF19.1708, ORF19.1768, ORF19.1785, ORF19.1789, ORF19.1791, ORF19.1961, ORF19.2539, ORF19.2746, ORF19.2822, ORF19.3204, ORF19.3210, ORF19.3214, ORF19.3215, ORF19.3439, ORF19.35.1, ORF19.3522, ORF19.36,*

		ORF19.3694, ORF19.4273, ORF19.5041, ORF19.5042, ORF19.5235, ORF19.5701, ORF19.6192, ORF19.6316.4, ORF19.6455, ORF19.6456, ORF19.6491, ORF19.6493, ORF19.6607, ORF19.6861, ORF19.6862, ORF19.725
	Hydrolase-Aktivität	*PTC2, RAS1, RBD1, SAP98, SAP99, SNU114, ORF19.1029, ORF19.1355, ORF19.1767, ORF19.265, ORF19.81*
	Proteinbindung	*GCN4, RCY1, TUP1, ORF19.1229, ORF19.1376, ORF19.1531, ORF19.1767, ORF19.264, ORF19.3438, ORF19.4557*
	Transferase-Aktivität	*HEM3, KSP1, LEU42, RPA190, XKS1, ORF19.1356, ORF19.1761, ORF19.6492, ORF19.6966*
	Transporter	*ALR1, FCY21, VRG4, ORF19.1210, ORF19.1229, ORF19.2749, ORF19.3218, ORF19.6316*
	RNA-Bindung	*LYS1, ORF19.1531, ORF19.1833, ORF19.265, ORF19.6008, ORF19.81*
	Lipid-Bindung	*ROM2, ORF19.1376, ORF19.1994, ORF19.7038*
	Peptidase	*RBD1, SAP98, SAP99, ORF19.1767*
	DNA-Bindung	*CPH1, GCN4, RPA190, TBP1*
	Oxidoreduktase	*DIT2, LYS1, PUT1*
	Ligase	*ADE6, ORF19.4629*
	Proteinkinase	*KSP1, ORF19.6492*
	Enzymregulator-Aktivität	*ROM2, ORF19.3216*
	Lyase	*URA3*
	Nukleotidyltransferase	*RPA190*
	Phosphoprotein-Phosphatase	*PTC2*
	Signalweiterleitungs-Aktivität	*ROM2*
	Isomerase	*ORF19.1833*
	keine GO-Slim Kategorie-Zuordnung	*ARG83, ATX1, BCR1, DIT1, MET18, RGT1, UME6, ORF19.1707, ORF19.1766, ORF19.1834, ORF19.2925, ORF19.4703, ORF19.5702, ORF19.6608*

Mit Hilfe des „GO Slim Mapper"-Programms wurden die ermittelten 5´- und 3´-Gene - basierend auf der ChIP-chip-Analyse unter Hypheninduktionsbedingungen - in allgemeine funktionelle Kategorien eingeordnet.

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich die chromosomalen Binderegionen von Efg1 während der beginnenden Hyphendifferenzierung im Vergleich zum Wachstum in der Hefeform komplett verändern. Zudem geht aus den Ergebnissen hervor, dass die umfangreiche Umprogrammierung der Efg1-abhängigen Regulation zeitlich sehr schnell erfolgt.

3.8.2.3 Analysen zur Efg1-Konsensus-Bindesequenz während der Hypheninduktion

Die RSAT-Motiv-Suche innerhalb der 64 identifizierten Efg1-Binderegionen (158 bp bis 4703 bp lang) während der Hypheninduktion ergab keine Häufung EGR-ähnlicher Sequenzen wie unter Hefewachstumsbedingungen. Die überrepräsentierten, identifizierten Trinukleotidpaare und ermittelten, potentiellen Efg1-Konssensussequenzen zu Beginn der Hyphenentwicklung sind in Abb. 3.27 dargestellt. Auffällig ist, dass vor allem AG- bzw. AC-

reiche Sequenzmotive detektiert wurden, wobei die ersten beiden Konsensussequenzen sehr ähnlich zu den ermittelten Konsensussequenzen unter Hefewachstumsbedingungen scheinen.
Die Suche nach bereits bekannten ähnlichen regulatorischen Erkennungsmotiven mit Hilfe des MATCH-Programms (http://www.gene-regulation.com/cgibin/pub/programs/match/bin/match.cgi) zeigte einige vergleichbare Motivsequenzen auf.

Hypheninduktion

Rang	Sequenz	p-value	E-value
1	aagn{0}aag	1.4e-42	6.1e-38
2	agan{3}aga	1.7e-41	7.1e-37
3	agan{0}aga	1.3e-40	5.4e-36
4	gaan{3}gaa	8.7e-40	3.7e-35
5	aacn{0}aac	4.4e-38	1.9e-33

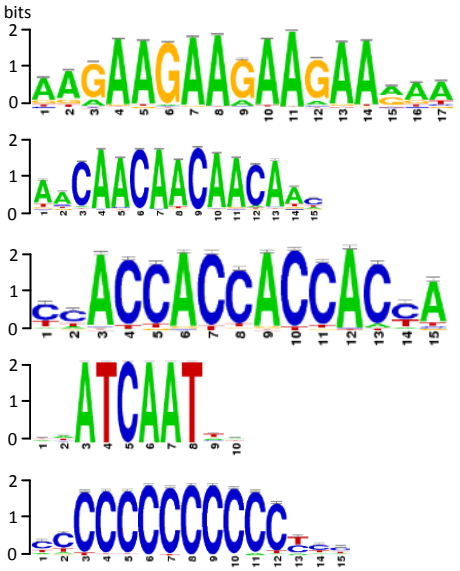


Abb. 3.27: Vorhersage von Efg1-Bindemotiven während der Hypheninduktion von *C. albicans*. Das Programm „RSAT dyad-analysis“ (van Helden, 2003) wurde benutzt, um Efg1-Erkennungssequenzen innerhalb der 64 signifikanten Efg1-Bindepeakregionen 30 Minuten nach Hypheninduktion zu detektieren. Links dargestellt ist eine tabellarische Rangordnung überrepräsentierter Trinuklotidpaare (dyads) und die dazugehörigen p- und E-Werte; Dyad-abgeleitete Nukleotidverteilungs-Matrizen sind rechts daneben abgebildet und zeigen potentielle Hypheninduktions-spezifische Konsensussequenzen für Efg1.

So wurde die Bindestelle AGAAG für das Hitzeschock-Protein Hsf1 (Giardina and Lis, 1995) gefunden. Des Weiteren wurden die Homöobox-Bindesequenz ACAAC (Catron *et al.*, 1993) und das CCCC/GGGG-Bindeelement für den Transkriptionsfaktor Adr1 (Thukral *et al.*, 1991) in *S. cerevisiae* ermittelt, welche sich in den Efg1-Konsensussequenzen wiederfinden.
Es lässt sich zusammenfassen, dass die EGR-Box und deren Derivate unter Hypheninduktionsbedingungen kein Efg1-Bindeziel sind. Stattdessen werden andere Hypheninduktions-spezifische Efg1-Bindesequenzen bevorzugt.

3.9 Relativer Transkriptspiegel des Gens *TCC1* während der Hypheninduktion

Es sollte untersucht werden, ob der Transkriptspiegel von *TCC1* während der Hypheninduktion vergleichbar zum *EFG1*-Transkriptspiegel ist, da zwischen beiden Genen

auffällige Gemeinsamkeiten festgestellt wurden. Der *EFG1*-Promotor als auch der *TCC1*-Promotor gehörten zu den beiden Hauptzielsequenzen von Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen, während jegliche Efg1-Interaktioen mit beiden Promotoren 30 Minuten nach Hypheninduktion nicht mehr existierten. Des Weiteren sind beide Gene durch eine fast gleich lange Stromaufwärts-Region (*EFG1*: ~ 10 bk; *TCC1*: ~ 9 kb) gekennzeichnet und weisen zwei Transkriptionsstartpunkte - für ein langes und ein kürzeres Transkript - auf. Für die Quantifizierung des *TCC1*-Transkriptspiegels wurden wie auch zur Bestimmung des *EFG1*-Transkriptspiegels cDNA-Proben unterschiedlicher Erntezeitpunkte nach Hypheninduktion aus dem Wildtyp-Stamm CAI4 analysiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie für *EFG1* in Abschnitt 3.2.
Die Abb. 3.28 zeigt die ermittelten *TCC1*-Transkriptlevel nach Normalisierung zum Aktin-Transkript von zwei unabhängigen qPCR-Experimenten. Ganz zu Beginn der Hypheninduktion (Zeitpunkt -1 min bis 10 min) ist ähnlich wie bei *EFG1* ein Abfall im *TCC1*-Transkriptspiegel registrierbar, jedoch ist diese beobachtete 1,5- bis 2-fache

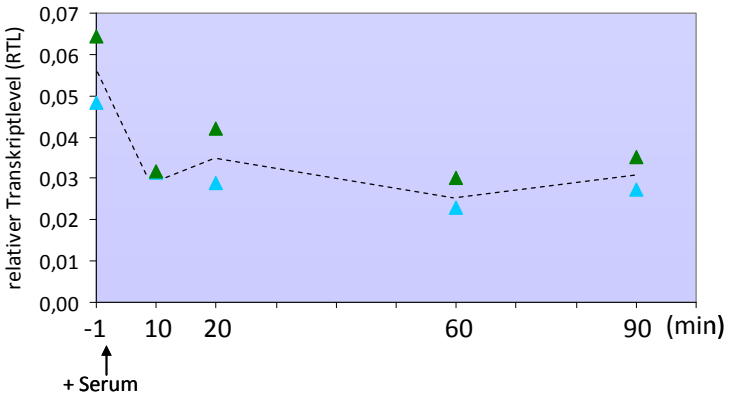


Abb. 3.28: Relativer *TCC1*-Transkriptspiegel während der Hypheninduktion. Der Wildtyp-Stamm CAI4 wurde auf eine OD_{600} = 0,2 inokuliert und für 10 Minuten in YP-Medium bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden zur Hypheninduktion 10 % Serum zugegeben und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Zum Zeitpunkt -1 min erfolgte die Zellernte kurz vor Serumzugabe. Die relativen Transkriptlevel (RTL) des *TCC1*-Gens der unterschiedlichen Hypheninduktions-Zeitpunkte wurden durch qPCR mit Aktin als Referenzgen ermittelt. Die Dreiecke (grün und blau) eines jeden Zeitpunkts zeigen die relativen *TCC1*-Transkriptlevel von zwei unabhängigen RNA-Präparationen (biologische Replikate).

Herabregulation bei Weitem nicht so drastisch wie beim *EFG1*-Transkript. Weiterhin ist festzuhalten, dass zum Zeitpunkt kurz vor Serumzugabe (-1 min) eine Schwankung im *TCC1*-Transkriptlevel zwischen den beiden biologischen Replikaten auftritt. Hier wäre die Analyse eines dritten biologischen Replikats von Vorteil gewesen. Zwischen den Zeitpunkten 10, 20, 60 und 90 Minuten nach Zugabe von Serum zum Kulturansatz sind keine eindeutigen Unterschiede im *TCC1*-Transkriptlevel messbar gewesen.

Es kann zusammengefasst werden, dass das *TCC1*-Transkript zu Beginn der Hypheninduktion herabreguliert wird, jedoch ist der Effekt in deutlich abgeschwächter Form im Vergleich zum *EFG1*-Transkript zu beobachten.

4 Diskussion

C. albicans besiedelt als Kommensale den menschlichen Körper und kann bei einem geschwächten Immunsystem oberflächliche Infektionen aber auch lebensgefährliche systemische Mykosen auslösen (Odds, 1994). Wichtig für die Virulenz des Hefepilzes ist seine Fähigkeit in verschiedenen morphologischen Formen zu wachsen. Von größter Bedeutung ist dabei der Dimorphismus, der Wechsel zwischen der Hefe- und der filamentösen Hyphenform. Während das Hefewachstum wichtig für eine schnelle Vermehrung und Verbreitung über den Blutstrom ist, begünstigt die hyphale Wuchsform die Adhäsion an Epithelien und Endothelien und deren anschließende Penetration, gefolgt von einer möglichen Invasion in tiefere Gewebeschichten. Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist dabei ein entscheidender Regulator des Dimorphismus. So ist die *efg1*-Mutante, welche unter normoxischen Bedingungen zur Hyphenausbilung nicht mehr fähig ist, avirulent im Tiermodell (Lo *et al.,* 1997). Neben seiner Funktion als globaler Regulator der Morphogenese steuert Efg1 zudem auch den Metabolismus in *C. albicans*. Efg1 zählt zu den APSES-Proteinen, die alle - mit einer Ausnahme - in Ascomyceten gefunden wurden und in die Regulation morphogenetischer Prozesse involviert sind. Sie sind durch eine 100 Aminosäuren große, hoch konservierte APSES-Domäne charakterisiert, innerhalb welcher ein bHLH-Motiv zur DNA-Bindung und Dimerisierung lokalisiert ist. Als Transkriptionsfaktor bindet Efg1 - vermutlich als Homodimer (Kurtz, 2010) - an Promotorbereiche von Genen und aktiviert oder reprimiert deren Transkription. Es wird angenommen, dass *EFG1* einer negativen Autoregulation unterliegt. Erste Hinweise erbrachte eine Northern-Blot-Analyse, in der sich zeigte, dass der *EFG1*-Transkriptspiegel während der Hypheninduktion stark abnimmt (Stoldt *et al.,* 1997; Tebarth *et al.,* 2003). Unterbleibt diese Transkript-Herabregulation, können keine echten Hyphen ausgebildet werden. Des Weiteren führte die Überexpression von *EFG1* zu einer reduzierten *EFG1*-Promotoraktivität in Reporterstudien (Tebarth *et al.,* 2003). Dieses lieferte den ersten Hinweis, dass der *EFG1*-Promotor vermutlich ein direktes Bindeziel von Efg1 ist und seine eigene Transkription negativ reguliert. EMSA-Studien bestätigten die Bindung von Efg1 an ein 408 bp-Fragment des *EFG1*-Promotors (Bußmann, 2006; Kurtz, 2010). Darüber hinaus konnte durch eine DNA-Footprint-Analyse die Bindung von Efg1 an eine 13 bp-Region innerhalb des 408 bp-Fragments gezeigt werden, welche wiederum das Palindrom TATGCATA (EGR-Box) beinhaltet und unter Einbezug der direkten Sequenzumgebung in einer Dreifachfolge auftritt (Bußmann, 2006). Es wurde vermutet, dass dieses Palindrom allgemein eine wichtige Rolle bei der Regulation durch Efg1 spielen könnte.
Insgesamt sind die molekularen Mechanismen der *EFG1*-Regulation nur wenig verstanden. Auch konnten direkte Efg1-Zielgene - bis auf *EFG1* - bisher nicht identifiziert werden. Zudem bleibt die Frage nach einem Efg1-Bindemotiv *in vivo* ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten *EFG1*-Promotor-Deletionsstudien zu einem besseren Verständnis der *EFG1*-Autoregulation beitragen und die Bedeutung der EGR-Box TATGCATA für die Efg1-Regulation untersucht werden. Zudem wurden genomweite ChIP-chip-Analysen

durchgeführt, wobei der *EFG1*- und der *TCC1*-Promotor als Hauptbindeziele von Efg1 in der Hefewuchsform identifiziert wurden. Diese Bindungen waren jedoch unter Hypheninduktionsbedingungen nicht mehr feststellbar. Darüber hinaus konnte ein generell unterschiedliches Bindemuster unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen festgestellt werden. Zudem erbrachte die Analyse der genomweiten ChIP-chip-Daten unterschiedliche potentielle Efg1-Bindemotive für die Hefewuchsform und für die Hypheninduktionsphase, wobei die bisher angenommenen Bindemotive, wie die E-Box (CANNTG) (Stoldt *et al.,* 1997; Leng *et al.,* 2001) und das MCB-Element (ACGCGT) (Doedt, 2003; Hilbig, 2004; Noffz *et al.,* 2008), als Efg1-Erkennungssequenzen ausgeschlossen werden können.

4.1 Efg1 bindet genomweit verschiedene chromosomale Regionen unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen

Mit Hilfe von ChIP-chip-Analysen wurden Efg1-Binderegionen sowohl unter Hefewachstums- als auch unter Hypheninduktionsbedingungen innerhalb aller acht Chromosomen des *C. albicans*-Genoms identifiziert, wobei die Efg1-Bindestellen (Peaks) jeweils unterschiedlich waren und auch keine Überlappungen hoch signifikanter Bindepeaks zwischen den beiden Wachstumsbedingungen festgestellt wurden. Unter Hefewachstumsbedingungen waren die meisten (92 %) Binderegionen außerhalb kodierender Bereiche lokalisiert, während unter Hypheninduktionsbedingungen die Mehrheit (70 %) der Efg1-Bindestellen ORF-Sequenzen umfasste, woraus ein unterschiedliches Efg1-Bindemuster bzw. -Regulationsmuster zwischen der Hefewuchsform und der Hypheninduktionsphase ersichtlich wird.
Die Efg1-Bindestellen der Hefewuchsform konnten Genen zugewiesen werden, die in das filamentöse Wachstum, den *white-opaque*-Phänotypwechsel (Zelldifferenzierung) und die Regulation der Genexpression involviert sind (Abschnitt 3.8.1.2; Tab 3.1). Mehr als die Hälfte der Gene mit einer stromaufwärts gelegenen Efg1-Bindestelle waren allerdings uncharakterisiert in ihrer Funktion. Zu den Hauptzielsequenzen von Efg1 gehörten die Stromaufwärtsregionen des *EFG1*-ORFs und des *TCC1*-ORFs, die unter Hefewachstumsbedingungen mehrfache Efg1-Bindestellen aufwiesen, jedoch 30 min nach Hypheninduktion nicht mehr von Efg1 gebunden wurden (Abschnitt 3.8.2.1; Abb. 3.25, Abb. 3.26). *TCC1* kodiert dabei für einen Repressor der Hyphenbildung, welcher mit dem Tup1-Repressor interagiert (Kaneko *et al.,* 2006). Weitere Gene, die für Repressoren der Filamentbildung kodieren, wiesen ebenfalls Efg1-Bindestellen in ihren Promotorregionen in der Hefewuchsform auf; dazu zählen die Regulatoren Nrg1 (Braun *et al.,* 2001; Murad *et al.,* 2001), Rfg1 (Kadosh und Johnson, 2001; Khalaf und Zitomer, 2001), Cpp1 (Csank *et al.,* 1997) und Efg1 unter hypoxischen Bedingungen (Doedt *et al.,* 2004). Andererseits hat Efg1 auch an Stromaufwärtsregionen von Genen gebunden, die für Aktivatoren des Hyphenwachstums kodieren, wie Def1 (Eed1) (Kadosh und Johnson, 2001; Martin *et al.,* 2011), Tec1 (Schweizer *et al.,* 2000; Lane *et al.,* 2001), Czf1 unter eingebetteten Wachstumsbedingungen (Brown *et al.,* 1999) und Efg1 unter Normoxie (Doedt *et al.,* 2004). Bei fast allen der oben aufgezählten Regulatoren handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Dies bestätigt die Rolle von Efg1 als Schlüsselregulator, der verschiedene Prozesse über intermediäre Transkriptionsfaktoren

lenkt. Daher ist es auch nicht überraschend, dass viele bekannte Efg1-regulierte Gene keine potentiellen Efg1-Bindestellen besitzen, da sie über derartige Zwischen-Faktoren reguliert werden.
Während der Hypheninduktion waren andere Genomregionen mit Efg1 besetzt als unter Hefewachstumskonditionen (Anhang-Tab. 9.1 und Tab 9.2). So erwies sich beispielsweise der Promotor von *UME6* als neues Efg1-Bindeziel 30 Minuten nach Hypheninduktion. *UME6* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die Hyphenbildung, vor allem aber für das hyphale Längenwachstum, wichtig ist und unterhalb von Efg1 im Signalweg liegt (Banerjee *et al.,* 2008). Auch die Promotorregion des *HWP1*-Gens*,* welches spezifisch während des Hyphenwachstums exprimiert wird und für ein Zellwandprotein kodiert, weist eine - allerdings eine nicht sehr starke - Efg1-Anreicherung auf. Möglicherweise sind die beiden Proteine, Nhp6 und Gcf1, welche mit dem HCR (*HWP1 control region*)-Bereich des *HWP1*-Promotors assoziieren (Kim *et al.,* 2007), in die Efg1-vermittelte Regulation involviert, da die Efg1-Binderegion die HCR-Region beinhaltet. Anders als zuvor in der Publikation von Lu *et al.* (2008) gezeigt, konnte keine Efg1-Bindung an die Promotorregionen der Hyphen-spezifischen Gene *ALS3* und *ECE1* - weder unter Hypheninduktions- noch unter Hefewachstumsbedingungen - festgestellt werden. Dies kann in den experimentellen Unterschieden begründet liegen, wie z.B. in der Nutzung des TAP-markierten Efg1 in den ChIP-Analysen bei Lu *et al.* (2008), wohingegen in dieser Arbeit HA-Epitop-markiertes Efg1 verwendet wurde. Weiterhin wurden die *C. albicans*-Zellen für die Analysen bei Lu *et al.* (2008) nicht für 30 Minuten unter Hyphenwachstumsbedingungen induziert, sondern über einen deutlich längeren Zeitraum von 3,5 Stunden; dieses resultierte in der Bildung mehrzelliger, langer Filamente mit einer Mischung aus jungen (Hyphenspitze) und alten Hyphe-Zellkompartimenten mit unterschiedlichen Efg1-Bindemustern. Unter Hypheninduktionsbedingungen war insgesamt eine große Bandbreite an Genen betroffen, die den Efg1-Binderegionen benachbart waren. Wahrscheinlich reguliert Efg1 während des hyphalen Wachstums viele unterschiedliche Prozesse, während Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen hauptsächlich die Morphogenese steuert bzw. justiert.

4.2 Die EGR-Box TATGCATA wird als Efg1-Erkennungssequenz unter Hefewachstumsbedingungen vorausgesagt

Durch eine Motiv-Analyse mit Hilfe des RSAT-Programms, basierend auf den 69 unter Hefewachstumsbedingungen genomweiten Efg1-Binderegionen, wurde die EGR-Sequenz TATGCATA als Efg1-Konsensussequenz identifiziert (Abb. 3.23). In diesem Zusammenhang gehörten die Motive ATGCAT und TATGCA/TGCATA, welche sich in der EGR-Sequenz wiederfinden, zu den am häufigsten präsenten Trinukleotidpaaren innerhalb der durch Efg1 gebundenen Genomregionen. So weisen 62 % der 69 Efg1-Binderegionen das Kern-Motiv ATGCAT mindestens einmal auf und etwas mehr als 78 % beinhalten mindestens eine TATGCA- bzw. TGCATA-Sequenz. Die fast vollständige EGR-Box TATGCAT/ATGCATA kann in 48 % der Efg1-Binderegionen jeweils mindestens einmal gefunden werden und die perfekte 8 bp lange EGR-Box TATGCATA ist in 17,4 % der durch Efg1 gebundenen Regionen jeweils mindestens einmal auszumachen (Tab. 4.1). Unter Hypheninduktionsbedingungen wurde die

EGR-Box hingegen nicht als Erkennungssequenz von Efg1 vorausgesagt, was sich auch in der deutlich niedrigeren Anzahl der Efg1-Bindesequenzen mit vorhandener EGR-Box bzw. mit EGR-Box-Derivaten und im niedrigen Gesamt-Vorkommen der EGR-(verwandten) Boxen widerspiegelt (Tab 4.1).

Tab. 4.1: Vorkommen der EGR-Box und der EGR-Box-Derivate innerhalb der Efg1-Binderegionen unter Hefewachsumsbedingungen und unter Hypheninduktionsbedingungen.

EGR-Box / EGR-Derivat	Hefewachstum		Hypheninduktion	
	Efg1-Binderegionen	Gesamt-anzahl	Efg1-Binderegionen	Gesamt-anzahl
TATGCATA	17,4 % (12)	16	1,5 % (1)	1
TATGCAT / ATGCATA	48 % (33)	56	12,5 % (8)	8
ATGCAT	62,3 % (43)	78	20,3 % (13)	15
TATGCA / TGCATA	78,3 % (54)	154	39 % (25)	31

Die Analyse basiert auf 69 Hefe-Efg1-Binderegionen und 64 Hyphe-Efg1-Binderegionen (Efg1-Binderegionen in Anhang-Tabellen 9.1 und 9.2). Dargestellt ist der Prozentsatz bzw. die Anzahl der Efg1-Binderegionen, die mindestens eine EGR-Box oder mindestens ein entsprechendes EGR-Box-Derivat enthalten (2. und 4. Spalte). Zudem ist die Gesamtanzahl der EGR und EGR-verwandten Sequenzen innerhalb der 69 (Hefe) bzw. 64 (Hyphe) Efg1-Binderegionen aufgeführt (3. und 5. Spalte).

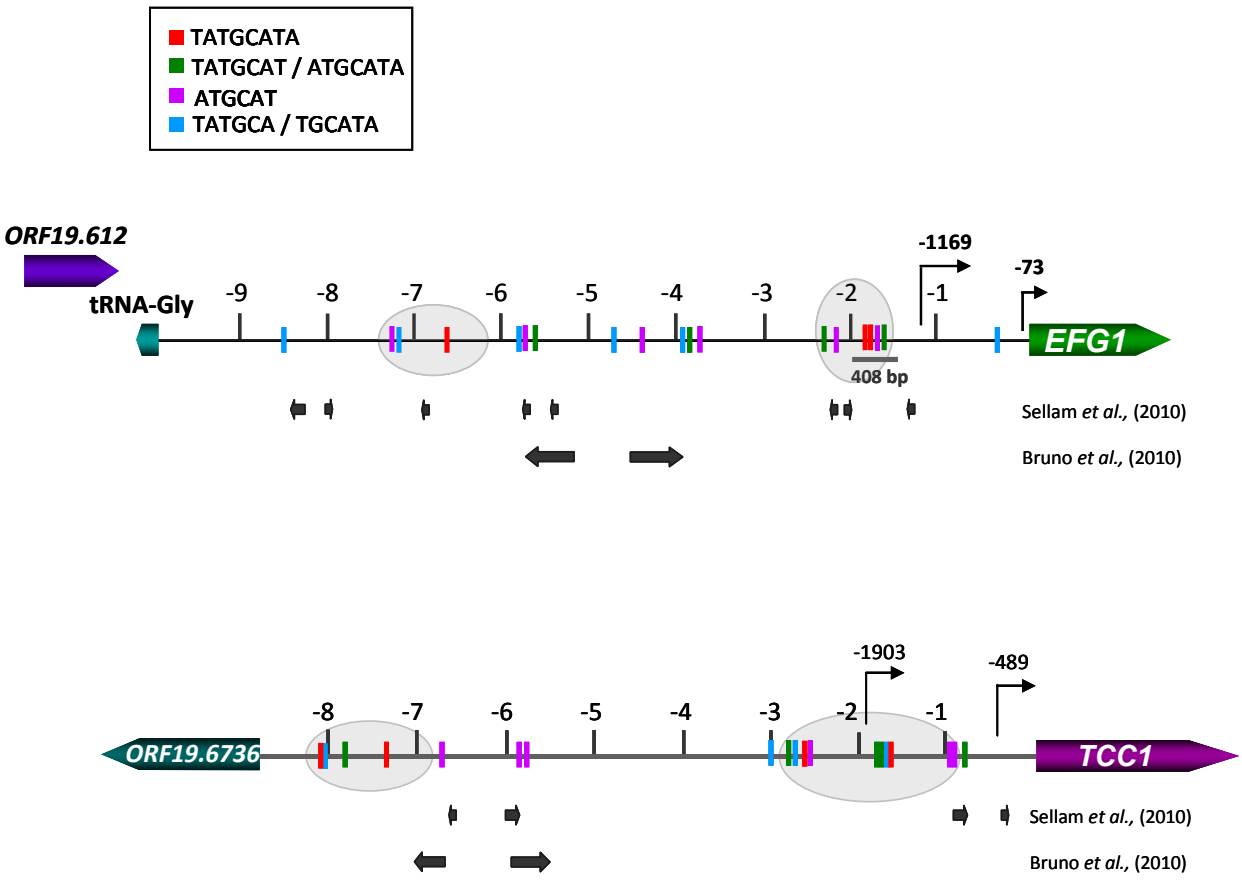


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Stromaufwärtsregion von *EFG1* und *TCC1*. Potentielle Efg1-Bindesequenzen (EGR- (TATGCATA) und EGR-ähnliche Motive) im *EFG1*- und *TCC1*-Promotor sind durch farbige Linien angezeigt. Die Unterteilung der intergenen Region ist in kb (relativ zum ATG) angegeben. Die grauen Ovale kennzeichnen die Positionen der durch ChIP-chip ermittelten Efg1-Bindepeaks unter Hefewachstumsbedingungen. Im Fall des *EFG1*-Promotors sind nur die beiden Hauptbindepeakregionen hervorgehoben, welche auf zwei (von drei) biologischen Replikaten basieren. Zudem sind die Transkriptionsstartpunkte von *EFG1* und *TCC1* in bp relativ zum ATG angegeben. Die schwarzen Pfeile unterhalb der intergenen Bereiche repräsentieren transkribierte Regionen (Assembly 21, *C. albicans* SC5314; http://www.candidagenome.org/), welche in den genomweiten Transkriptomstudien von Sellam *et al.* (2010) und Bruno *et al.* (2010) identifiziert wurden.

Zu den Hauptbindezielen von Efg1 zählten die Promotorregionen von *EFG1* und *TCC1* unter Hefewachstumsbedingungen. Dadurch, dass die Efg1-Binderegionen mit allen vorhandenen EGR-Boxen (TATGCATA) der Stromaufwärtsregionen beider Gene übereinstimmen (Abb. 4.1), wird die EGR-Box als potentielle Efg1-Erkennungssequenz bekräftigt. Zudem bestätigen die *in vitro* EMSA- und insbesondere die DNA-Footprint-Analysen die Bindung von Efg1 an die EGR-Sequenz (Bußmann, 2006). Unter Hypheninduktionsbedingungen wird die EGR-Box oder ein ähnliches Motiv hingegen nicht als Efg1-Bindesequenz genutzt (Abb. 3.27).

4.3 Die E-Box dient nicht als Bindesequenz für Efg1

Der Transkriptionsfaktor Efg1 zählt zu den APSES-Proteinen, welche ein zentral gelegenes konserviertes basisches-Helix-Loop-Helix (bHLH)-Motiv innerhalb der APSES-Domäne enthalten. Für viele bHLH-Proteine ist bekannt, dass sie an E-Boxen der Konsensussequenz CANNTG im Promotorbereich ihrer Zielgene binden (Massari und Murre, 2000; Robinson und Lopes, 2000; Nasi *et al.,* 2001). Zu den gut untersuchten bHLH-Transkriptionsfaktoren gehören Myc, Max und MyoD aus Säugern. Myc und Max binden dabei an die E-Box-Sequenz CACGTG, während MyoD die Sequenz CAGCTG erkennt. Aufgrund der großen Homologie zwischen den bHLH-Motiven dieser Proteine und Efg1 - insbesondere innerhalb der für die DNA-Bindung wichtigen konservierten Aminosäuren - wurde vermutet, dass auch Efg1 die E-Box als Bindesequenz nutzen könnte (Stoldt *et al.,* 1997). Bisher konnte die Bindung einer E-Box durch Efg1 nur *in vitro* in Gelverzögerungsexperimenten gezeigt werden (Leng *et al.,* 2001). Eine *in vivo*-Bindung an eine E-Box durch Efg1 oder durch ein anderes APSES-Protein konnte bis heute allerdings nicht nachgewiesen werden (Stoldt *et al.,* 1997; Hilbig, 2004). Die Motivanalyse mit Hilfe des RSAT-Programms, welche auf Basis der signifikanten Efg1-Binderegionen der Hefe- und Hyphenform durchgeführt wurde, ergab keine E-Box-Variante als potentielles Erkennungsmotiv für Efg1. Interessanterweise enthalten jedoch 93 % (60/69) der durch HA-Efg1 gebundenen chromosomalen Regionen unter Hefewachstumsbedingungen mindestens eine E-Box der Sequenz CANNTG. Die unter Hypheninduktionsbedingungen identifizierten Efg1-Binderegionen weisen in fast 83 % (53/64) der Fälle mindestens eine E-Box-Sequenz auf. In Tabelle 4.2 ist eine Übersicht zum Vorkommen der verschiedenen E-Box-Varianten innerhalb der Efg1-Binderegionen unter beiden Wachstumsbedingungen dargestellt (prozentualer Anteil der Efg1-Binderegionen mit einer bestimmten E-Box-Sequenz). Es fällt auf, dass über 50 % der mittels ChIP-chip

identifizierten Efg1-Binderegionen sowohl der Hefewuchsform (50,7 %) als auch der Hypheninduktions-Form (56,2 %) mindestens eine E-Box der Sequenz CATTTG/CAAATG enthalten. In *in vitro* Untersuchungen konnte die Bindung von Efg1 an das *ALS3*-Promotorfragment, welches die E-Box CATTTG enthält, nachgewiesen werden (Leng *et al.,* 2001). Allerdings weist dieses Promotorfragment neben der E-Box auch zwei EGR-Box-Derivate der Sequenz ATGCAT auf, welche in den Oligonukleotiden der EMSA-Negativ-Kontrolle in ihrer Sequenz ebenfalls verändert waren. So ist es denkbar, dass die *in vitro* Efg1-Bindung nicht an die E-Box, sondern an das EGR-Kernmotiv ATGCAT erfolgte.

Tab. 4.2: Vorkommen von E-Boxen innerhalb der Efg1-Binderegionen unter Hefewachstumsbedingungen und unter Hypheninduktionsbedingungen.

E-Box (CA**NN**TG)	**Hefewachstum**		**Hypheninduktion**	
	Efg1-Binderegionen			
CA**GC**TG	17,4 %	(12/69)	6,25 %	(4/64)
CA**CG**TG	8,7 %	(6/69)	4,7 %	(3/64)
CA**CC**TG / CA**GG**TG	18,8 %	(13/69)	14,1 %	(9/64)
CA**CA**TG / CA**TC**TG	26,1 %	(18/69)	23,4 %	(15/64)
CA**GT**TG / CA**AC**TG	33,3 %	(23/69)	35,9 %	(23/64)
CA**CA**TG / CA**TG**TG	29 %	(20/69)	9,4 %	(6/64)
CA**CT**TG / CA**AG**TG	40,6 %	(28/69)	29,7 %	(19/64)
CA**AT**TG	39,1 %	(27/69)	51,6 %	(33/64)
CA**TA**TG	37,7 %	(26/69)	20,3 %	(13/64)
CA**TT**TG / CA**AA**TG	50,7 %	(35/69)	56,2 %	(36/64)

Aufgezeigt ist der Prozentsatz und die Anzahl (in Klammern) der durch Efg1 gebundenen genomweiten Regionen, welche die entsprechenden E-Box-Varianten enthalten. Dabei kann eine Efg1-Binderegion verschiedene E-Box-Typen enthalten aber auch eine E-Box-Variante mehrfach aufweisen. Das mehrfache Vorhandensein einer E-Box-Variante ist in der Tabelle nicht aufgezeigt/berücksichtigt. Die Analyse basiert auf 69 Hefe-Efg1-Binderegionen und 64 Hyphe-Efg1-Binderegionen (Anhang-Tabellen 9.1 und 9.2).

Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass in *in vivo* Ein-Hybrid-Analysen eine Bindung an verschiedene E-Box-Sequenzen inklusive CATTTG nicht bestätigt werden konnte (Hilbig, 2004) und in der Sequenzumgebung - anders als bei dem verwendeten *in vitro ALS3*-Promotorfragment - auch keine EGR-Box bzw. kein EGR-Box-Derivat vorhanden war. Dadurch dass die verschiedenen E-Boxen - wie z.B. CA**TT**TG/CA**AA**TG, CA**CT**TG/CA**AG**TG oder CA**AT**TG - relativ oft in den chromosomalen Efg1-Binderegionen vorkommen, ist es möglich, dass für die Efg1-vermittelte Regulation bzw. Efg1-Sequenzerkennung die E-Box in Kombination mit der EGR-(ähnlichen) Box oder während der Hypheninduktion mit einem anderen Bindemotiv eine Rolle spielen könnte. Andererseits ist die E-Box allgemein relativ häufig im *C. albicans*-Genom zu finden. Die Tatsache, dass im Rahmen der DNA-Footprint-

Analyse keine der beiden E-Boxen (CAAATG und CAAGTG) innerhalb des 408 bp-*EFG1*-Promotorfragments von Efg1 gebunden wurden, sondern die 13 bp-Region mit der enthaltenden EGR-Box, spricht gegen die E-Box als Efg1-Erkennungssequenz.
In Abb. 4.2 ist zudem das Vorkommen der E-Box (CANNTG) innerhalb der Stromaufwärtsregionen von *EFG1* und *TCC1* dargestellt. Auffällig ist das massive Vorhandensein des E-Box-Motivs innerhalb der 5´-intergenen Region beider Gene. Dies bestätigt wiederum, dass die E-Box-Sequenz relativ häufig im Genom auftritt. Zudem kann keine auffällige Überlappung zwischen den Efg1-Bindepeakregionen (Ovale) und der E-Boxen-Lokalisation festgestellt werden; dies wird insbesondere im Fall des *TCC1*-Promotors sehr deutlich, der insgesamt zwei Efg1-Binderegionen aufweist, die E-Box-Sequenzen allerdings über die gesamte intergene Region verteilt sind. Im Fall von *EFG1* sind nur die beiden Efg1-Hauptbindebereiche markiert. Auch hier kann keine eindeutige Übereinstimmung registriert werden.

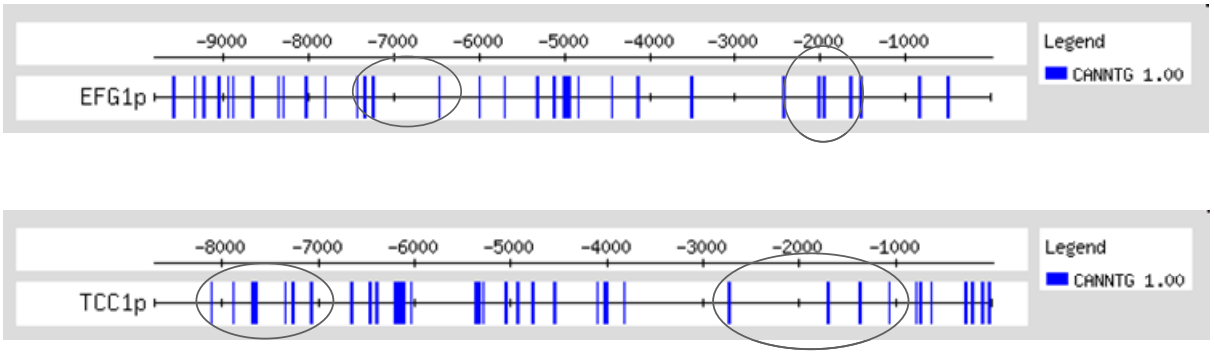


Abb. 4.2: Vorkommen der E-Box CANNTG innerhalb der 5´-intergenen Region von *EFG1* und *TCC1*. Dargestellt ist die Stromaufwärtsregion der Gene *EFG1* und *TCC1*. Die Positionen sind in bp relativ zum Translationstart angegeben. Der Wert 1.00 entspricht einer Homologie der E-Box-Sequenz CANNTG von 100 %. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms „RSAT“ erstellt (http://rsat.ulb.ac.be/). Die Ovale markieren die Efg1-Binderegionen, welche auf den ChiP-chip-Experimenten basieren; im Fall des *EFG1*-Promotors sind nur die beiden Hauptbindepeakregionen hervorgehoben, welche auf zwei (von drei) biologischen Replikaten basieren.

In einer Studie von Guccione *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass der epigenetische Umgebungskontext für die Bindung der E-Box CACGTG oder alternativer Sequenzen durch den Säuger-Transkriptionsfaktor Myc entscheidend ist; so muss die Bindesequenz mit einem Chromatinabschnitt assoziiert sein, der sich durch einen hohen Methylierungs- (H3 K4/K79) und Acetylierungsgrad (H3) auszeichnet. Daher kann vermutet werden, dass bei der Efg1-Bindung an seine Erkennungssequenz ebenfalls der benachbarte Histon-Code von Bedeutung ist.

4.4 Das MCB-Element fungiert nicht als Efg1-Erkennungssequenz

Auch die MCB-Box wird als potentielles Bindemotiv für APSES-Transkriptionsfaktoren angenommen. So weist die bHLH-Domäne der APSES-Proteine eine große Homologie zu der

N-terminalen DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Mbp1 aus *S. cerevisiae* auf (Koch *et al.,* 1993). Mbp1 bildet mit Swi6 den so genannten MBF (MCB-Binding-Factor)-Komplex und bindet als Heterodimer an MCB (*Mlu*I Cell cycle box)-Elemente der palindromischen Konsensussequenz ACGCGT (Koch und Nasmyth, 1994; McIntosh *et al*., 1991). MCB-Motive sind in *S. cerevisiae* im Promotorbereich vieler Zellzyklus-regulierter Gene zu finden. Für Efg1 konnte in Ein-Hybrid-Analysen sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *C. albicans* eine Bindung an das MCB-Element (ACGCGT) *in vivo* nachgewiesen werden (Doedt, 2004; Hilbig, 2004; Noffz *et al.,* 2008). Dieses konnte durch eine Gelretardierungsanalyse mit einem Oligonukleotid, bestehend aus einem dreifachen MCB-Element, *in vitro* bestätigt werden (Bußmann, 2006). Auch für das APSES-Protein StuA aus *Aspergillus nidulans* wurde eine *in vivo* Bindung an die MCB-Sequenz gezeigt (Dutton *et al.,* 1997). Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten genomweiten Efg1-Binderegionen kann das MCB-Element allerdings als Efg1-Bindesequenz ausgeschlossen werden. So ist das MCB-Palindrom ACGCGT innerhalb der 69 identifizierten Efg1-Bindepeakregionen unter Hefewachstumsbedingungen und innerhalb der 64 Efg1-Bindepeaks unter Hypheninduktionsbedingungen jeweils nur innerhalb einer Binderegion ein Mal zu finden (unterschiedlichen Chromosomen). Dementsprechend erwies sich das MCB-Element bei der RSAT-Analyse auch nicht als mögliches Efg1-Bindemotiv. Es fällt allerdings auf, dass die MCB-Sequenz ACGCGT ähnlich zur EGR-Kernsequenz ATGCAT ist; zwischen beiden besteht eine Übereinstimmung in vier von sechs Basen. Diese Ähnlichkeit könnte ein Grund dafür sein, dass Efg1 in Ein-Hybrid-Analysen an das MCB-Element gebunden hat, auch wenn es nicht die optimale Bindesequenz darstellt, die in *C. albicans* als Erkennungssequenz tatsächlich genutzt wird. Durch genomweite Transkriptom-Analysen in *C. albicans* konnten viele in Abhängigkeit von Efg1 regulierte Gene identifiziert werden, von denen einige der am stärksten regulierten Gene, wie *YWP1* (*FLO1)* und *SAP2*, ein MCB-Element im Promotorbereich aufweisen (Doedt, 2003). Die Deletion dieses MCB-Elements zeigte in Reporterstudien jedoch keinen Einfluss auf die Promotor-Induktion (*YWP1*) bzw. Promotor-Repression (*SAP2*) dieser Gene durch Efg1. Dies bestätigt, dass die MCB-Box höchst wahrscheinlich nicht als Efg1-Erkennungssequenz fungiert.

4.5 *EFG1*-Regulation

Unter Hefewachstumsbedingungen konnte zwischen dem Wildtyp und der *efg1*-Mutante kein Unterschied bezüglich der *EFG1*-Promotoraktivität festgestellt werden (Abb. 3.3). Daher wird angenommen, dass die Efg1-Bindungen an den *EFG1*-Promotor nicht von Bedeutung für dessen Aktivität in der Hefewuchsform sind. Während des hyphalen Wachstums war hingegen eine herabgesetzte Promotoraktivität im Wildtyp, jedoch nicht in der *efg1*-Mutante zu beobachten, was eine Repression in Abhängigkeit von Efg1 verdeutlicht, auch wenn Efg1 30 Minuten nach Hypheninduktion nicht mehr an seinen Promotor bindet (Abb. 3.3; Abb. 3.25). Wahrscheinlich reguliert Efg1 den *EFG1*-Promotor innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls kurz nach Hypheninduktion negativ bevor es den Promotor verlässt (Abb. 4.3). Die *EFG1*-Promotoraktivität wurde zwar 90 Minuten nach Hypheninduktion bestimmt, es ist aber auch schon etwa 30 Minuten nach Induktion eine deutlich

herabgesetzte Luziferase-Aktivität im Wildtyp - wenn auch nicht eine genauso niedrige wie nach 90 Minuten - messbar gewesen (Daten nicht gezeigt). Durch den Einsatz des *RLUC*-Reportergens anstelle des *EFG1*-ORFs wurde allerdings eine unnatürliche genomische Situation geschaffen, weshalb der zeitliche Regulationseffekt womöglich nicht genau widergespiegelt werden kann. Kurz nach Hypheninduktion wurde ein sehr rapider Abfall im *EFG1*-Transkriptlevel beobachtet; innerhalb von zehn Minuten war dieser um etwa das sechsfache gesunken (Abb. 3.2), so dass die *EFG1*-mRNA-Halbwertszeit weniger als 5 Minuten betragen muss. Eine hohe mRNA-Abbaurate wird durch Adenosin- und Uridin-reiche Sequenzen (ARE; AU-rich elements) vermittelt, welche innerhalb des 3´-UTR-Bereichs lokalisiert sind. Ein charakteristisches Motiv dieser destabilisierenden Elemente ist das AUUUA-Pentamer, welches mehrfach in der 3´-UTR der *EFG1*-mRNA zu finden ist. Zudem ist aus vielen Eukaryonten bekannt, dass die stabilsten Transkripte einen kurzen 5´-UTR-Bereich besitzen, während die am wenigsten stabilen Transkripte eine lange 5´-UTR sowie eine lange 3´-UTR aufweisen (Davuluri *et al.,* 2000; Lackner *et al.,* 2007; Sellam *et al.,* 2010). Letzteres trifft auch auf *EFG1* zu. Aber auch weitere wichtige Regulatoren des filamentösen Wachstums, wie z. B. *RFG1*, *CZF1*, *CRZ2* oder *NRG1*, an deren Promotorregion Efg1 gebunden hat, verfügen über einen langen 5´-UTR-Bereich (Sellam *et al.,* 2010), was eine Regulation auf Ebene der mRNA-Stabilität vermuten lässt. Aus den Ergebnissen wird gefolgert, dass zu Beginn der Hypheninduktion zunächst eine starke *EFG1*-mRNA-Degradation erfolgt und die *EFG1*-Promotoraktivität Efg1-abhängig herabreguliert wird, wodurch die *EFG1*-Transkription angehalten wird. Im direkten Anschluss dissoziiert Efg1 von seinem Promotor ab. Der nach dem *EFG1*-mRNA-Abfall langsame Wiederanstieg des *EFG1*-Transkriptlevels während der Hypheninduktion kann sehr wahrscheinlich damit erklärt werden, dass der Septeneinzug innerhalb der längeren Hyphen (teilweise) schon erfolgt war und im älteren Zellkompartiment ein anderes regulatorisches Programm als in der apikalen Hyphenzelle ablief. Die *EFG1*-mRNA-Quantifizierung basierte zu den späteren Induktionszeitpunkten (60 - 90 min) auf der Gesamt-mRNA, die sowohl aus den Zellen der Hyphenspitze als auch aus den distal gelegenen, älteren Hyphenzellen stammte. Trotz der extremen Herabregulation des *EFG1*-Transkriptlevels kann allerdings keine signifikante Verminderung im Efg1-Gesamtproteinspiegel während der Hypheninduktion festgestellt werden (Kurtz, 2010), was auf eine posttranslationale Efg1-Regulation schließen lässt und zudem auf eine hohe Efg1-Proteinstabilität weist.

Durch verschiedene *EFG1*-Promotordeletionen (ΔGC; Δ3xEGR; Δ7xEGR; Δ5´-UTR; Δ7kb) im *EFG1p*-Lokus wurde versucht diejenige Region einzugrenzen, die wichtig für die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität während der Hypheninduktion ist (Abschnitt 3.4.1 bis 3.4.5, 3.4.7). Allerdings konnte die Efg1-abhängige Promotor-Repression durch keines der Deletionskonstrukte aufgehoben werden. Aufgrund der Luziferase-Aktivitätsmessungen ist anzunehmen, dass keine EGR-Box oder EGR-ähnliche Sequenz im Einzelnen bzw. die den Deletionsregionen entsprechenden Box-Kombinationen wirklich notwendig für die *EFG1*-Promotorrepression sind. Vermutlich können die deletierten EGR-(ähnlichen) Boxen durch andere EGR-(ähnliche) Boxen in ihrer Funktion kompensiert werden. Die ChIP-chip-Resultate zeigten eine mehrfache Bindung von Efg1 an die *EFG1*-Stromaufwärtsregion, wobei eine Korrelation zwischen den Efg1-Binderegionen und den

EGR-Boxen auffällig war (Abb. 3.21). Die Ergebnisse der *EFG1*-Promotor-Deletionsstudien verdeutlichen, dass für das Erfolgen der Efg1-vermittelten Promotorrepression offenbar nicht alle Bindepositionen mit Efg1 besetzt sein müssen. Einen Aufschluss über die Bedeutung der EGR-Boxen für die negative *EFG1*-Promotorregulation könnte die gleichzeitige Deletion aller vorhandenen EGR- und EGR-ähnlichen-Boxen in der Stromaufwärtsregion von *EFG1* bringen.

Die Aktivität verschiedener *EFG1*-Promotorfragmente (3,6 kb *EFG1p*; 1,4 kb *EFG1p*; 3,6 kb-Δ7xEGR *EFG1p*) wurde auch ektopisch im *RPS10*-Lokus untersucht (Abschnitt 3.4.6.1 und 3.4.6.2), welcher als neutraler Integrationsort in *C. albicans* gilt (Brand *et al.,* 2004). Dadurch sollte der Einfluss weiterer stromaufwärts gelegener EGR- bzw. EGR-ähnlicher Boxen ausgeschlossen werden können. Im *RPS10*-Lokus traten allerdings generell stärkere Schwankungen in den Messungen auf und die Luziferase-Werte für das 1,4 kb- und das 3,6 kb-Δ7xEGR-*EFG1p*-Fragment waren sehr niedrig (Abb. 3.10; Abb. 3.11), so dass keine eindeutigen Aussagen möglich sind. Trotz allem macht es den Anschein, dass die Efg1-vermittelte *EFG1*-Promotor-Herabregulation unter Hypheninduktionsbedingungen auch im *RPS10*-Lokus beobachtet werden kann und die 1,4 kb große *EFG1*-Promotorregion dafür ausreichend ist (Abb. 3.10). Mit dem 3,6 kb-Δ7xEGR-*EFG1*-Promotorfragment wurde ebenfalls eine reduzierte *EFG1*-Promotoraktivität im Wildtyp-Stammhintergrund unter hyphalen Bedingungen festgestellt, jedoch konnte diese auch unter Hefewachstumsbedingungen gemessen werden (Abb. 3.11). Das 3,6 kb-Δ7xEGR-*EFG1*-Promotorfragment enthält noch eine einzelne EGR-ähnliche Sequenz (TATGCA; -370 bp zum ATG) innerhalb des 5´-UTR-Bereichs. Zudem können auch innerhalb des *RPS10*-Gens, welches dem verkürzten *EFG1p*-Fragment direkt vorgeschaltet ist, eine EGR-ähnliche Box (TATGCA; 513-518 bp) sowie ein E-Box (CAACTG; 531-536 bp) festgestellt werden. Ein eventueller Einfluss dieser Sequenzen und weiterer stromaufwärts gelegener genomischer Regionen auf die Regulation kann nicht ausgeschlossen werden. Letztendlich bleibt es aufgrund der niedrigen Aktivitätswerte und der Messschwankungen zweifelhaft, ob die Integration der *EFG1p-RLUC*-Konstrukte in den *RPS10*-Lokus zur gleichen Regulation des *EFG1*-Promotors wie im nativen Lokus führt.

4.5.1 Die PKA-Isoform Tpk2 und der Transkriptionsfaktor Flo8 sind in die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität unter Hypheninduktionsbedingungen involviert

Es wurde überprüft, ob andere Komponenten außer Efg1 zur Regulation des *EFG1*-Promotors beitragen (Abschnitt 3.5). Dazu wurde die *EFG1p-RLUC*-Fusion ins Genom verschiedener Mutanten-Stämme integriert. Zum einen konnte eine Involvierung von Flo8 in die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität festgestellt werden, da die Luziferase-Aktivität in der *flo8*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter Hypheninduktionsbedingungen erhöht war (Abb. 3.13). Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass Efg1 die Hyphenbildung zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Flo8 induziert (Cao *et al.,* 2006). Interessant wäre es zu überprüfen, ob Flo8 - wie Efg1 selbst - womöglich auch an den *EFG1*-

Promotor bindet, zumal zwischen beiden eine Interaktion *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Cao *et al.,* 2006; Noffz *et al.,* 2008). Flo8 scheint für die *EFG1*-Promotor-Herabregulation jedoch nicht essentiell zu sein, da auch ohne *FLO8* eine verminderte Promotor-Aktivität in Relation zur Referenz feststellbar war. Des Weiteren lassen die Luziferase-Messungen den Schluss zu, dass die PKA-Isoform Tpk2, jedoch nicht die Tpk1-Isoform, für die negative *EFG1*-Promotorregulation unter Hypheninduktionsbedingungen benötigt wird; in dem Fall blieb die Reporter-Aktivität in der *tpk2*-Mutante etwa gleich hoch wie während des Hefewachstums bzw. war in Relation zum Wildtyp unter Hyphen-induzierenden Bedingungen deutlich erhöht (Abb. 3.13). Die Spezifität der PKA-Isoform könnte mit den experimentellen Wachstumsbedingungen in Zusammenhang stehen, da der Tpk2-Isoform eher eine Rolle bei der Hyphenbildung im flüssigen Medium zukommt, während die Tpk1-Isoform für die Hyphenbildung auf festem Medium wichtig ist (Bockmühl *et al.,* 2001). Kürzlich konnte mittels ChIP-chip-Analysen eine Bindung beider PKA-Isoformen, Tpk2 sowie Tpk1, innerhalb des *EFG1*-ORFs in der Hefewuchsform gezeigt werden; dabei überlappten beide Bindepeaks, wobei sich der Tpk2-Bindepeak über eine breitere Region im *EFG1*-ORF erstreckte als der Tpk1-Bindebereich (A. Fraund, pers. Mitteilung). Zudem ist aus *S. cerevisiae* bekannt, dass die Kinasen Tpk1 und Tpk2 des PKA-Signaltransduktionsweges kodierende Regionen ihrer Zielgene oder deren Promotorsequenzen besetzen (Pokholok *et. al.,* 2006). So ist es denkbar, dass die Tpk2-PKA-Isoform am *EFG1*-ORF in Bereitschaftsposition sitzt, um die am *EFG1*-Promotor und/oder am *EFG1*-ORF bindenden Efg1-Proteine schnell zu Beginn der Hypheninduktion phosphorylieren zu können, worauf

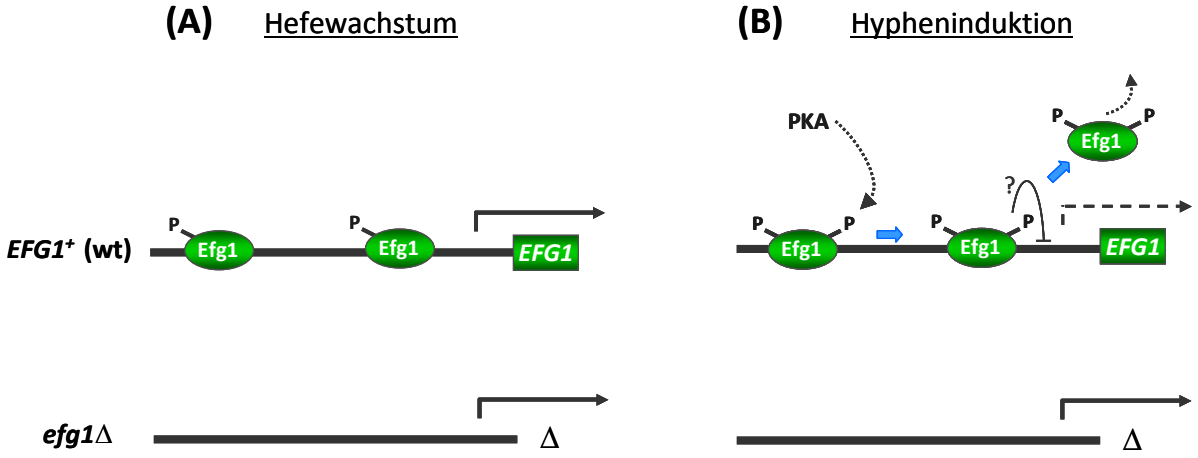


Abb. 4.3: Modell zur Regulation des *EFG1*-Promotors in *C. albicans* vor und nach Hypheninduktion. (A) Während des Wachstums in der Hefeform ist der *EFG1*-Promotor stark aktiv und wird innerhalb mehrerer Regionen von Efg1 gebunden. Allerdings ist die Efg1-Bindung für die Aktivität des *EFG1*-Promotors nicht notwendig, da diese im Wildtyp (*EFG1*$^{+}$) und in der *efg1*-Mutante (*efg1*Δ) gleich hoch ist. **(B)** Es wird angenommen, dass die PKA-Isoform Tpk2 den Transkriptionsfaktor Efg1 indirekt oder direkt zu Beginn der Hypheninduktion phosphoryliert, wodurch die *EFG1*-Promotoraktivität - eventuell zusammen mit Flo8 - schnell reprimiert wird und das gebundene Efg1 nahezu zeitgleich vom Promotor abdissoziiert. Die Inaktivierung des *EFG1*-Promotors könnte dabei mit Hilfe des Sin3/Rpd3-Histondeacetylase-Komplexes über Efg1 vermittelt werden.

das aktivierte Efg1 den *EFG1*-Promotor schnell reprimiert und vom Promotor abdissoziiert. Die Inaktivierung des *EFG1*-Promotors könnte unter Mitwirkung des Sin3/Rpd3-Histondeacetylase-Komlexes durch ein Verschließen der Chromatinstruktur vermittelt werden, wobei Efg1 anwesend sein muss, da eine Heabregulation des *EFG1*-Promotors in der *efg1*-Mutante nicht auftitt (Abb. 3.3). Zwar war die *EFG1*-Promotorrepression in der *sin3*-Mutante unter Hypheninduktionsbedingungen nicht aufgehoben (Abb. 3.13), jedoch zeigt die Mutante keine Herabregulation des *EFG1*-Transkripts (Tebarth *et al.,* 2003). Außerdem konnte zum einen die Bindung von Sin3 an den *EFG1*-Promotor unter Hyphenwachstumsbedingungen gezeigt werden und zum anderen wurde eine Efg1-Sin3-Interaktion durch Zwei-Hybrid-Analysen bestätigt (Tebarth *et al.,* 2003; Doedt, 2003). In Abb. 4.3 ist die Regulation des *EFG1*-Promotors in einem Modell zusammengefasst.

4.6 Efg1 reguliert den Repressor Tcc1

Die Stromaufwärtsregion von *TCC1* konnte unter Hefewachstumsbedingungen als ein Hauptbindeziel von Efg1 identifiziert werden (Abb. 3.22). Dabei korrelieren die beiden Efg1-Binderegionen zwischen dem *TCC1*-ORF und dem nächsten 5´-ORF (*ORF19.6736*) mit allen vorhandenen EGR-Boxen (TATGCATA) und einer Akkumulation EGR-ähnlicher Boxen (Abb. 4.1). Wie im Fall von *EFG1* selbst waren die Efg1-Bindungen 30 Minuten nach Hypheninduktion vollständig aufgehoben. Des Weiteren wurde kurz nach Hypheninduktion ein Abfall im *TCC1*-Transkriptspiegel beobachtet (Abb. 3.28). Dieser war in Relation zum Zeitpunkt kurz vor Hypheninduktion jedoch nur ca. 1,5- bis 2-fach vermindert und blieb während der nachfolgenden Hypheninduktionsphase auf etwa dem gleichen Level. *TCC1* kodiert für einen Repressor der Hyphenbildung, der mit dem Repressor Tup1 einen Komplex bildet (Kaneko *et al.*, 2006). So wurde gezeigt, dass Tcc1 und Tup1 allgemeine hypenspezifische Gene negativ regulieren (Kaneko *et al*., 2006). Die Deletion des *TCC1*-Gens äußert sich im pseudohyphalen Wachstum der Zellen unter Hefewachstumsbedingungen. Hypothetisch ist es möglich, dass Efg1 die Transkription von *TCC1* unter Hefewachstumsbedingungen induziert oder aber unter Hyphen-induzierenden Bedingungen inhibiert. Dies stünde im Einklang mit dem erhöhten *TCC1*-Transkriptlevel vor Hypheninduktion bzw. mit dem herabregulierten *TCC1*-Transkript kurz nach Hypheninduktion. Efg1 könnte einerseits durch seine Bindung an den *TCC1*-Promotor während des Wachstums in der Hefeform aktivierend wirken, andererseits könnte die Efg1-Abdissoziation kurz nach Hypheninduktion mit einer aktiven *TCC1*-Promotorrepression verknüpft sein. Möglich wäre auch, dass Efg1 sowohl die Aktivierung als auch die Repression des *TCC1*-Promotors steuert, da Efg1 als globaler Regulator sowohl als Aktivator als auch als Repressor wirken kann (Doedt *et al.,* 2004; Setiadi *et al.,* 2006). In genomweiten Transkriptomstudien zeigte sich eine um den Faktor 2,1 erhöhte *TCC1*-Transkription in der *efg1*-Mutante unter Hefewachstumsbedingungen (YPD, 30 °C) (Doedt, 2004). Dies lässt schlussfolgern, dass *TCC1* unter Hefewachstumsbedingungen in Abhängigkeit von Efg1 reprimiert wird.

4.7 Regulation des *SAP2*-Gens

Durch Transkriptomstudien wurde gezeigt, dass das für eine Aspartylprotease kodierende Gen *SAP2* Efg1-abhängig reguliert ist (Doedt, 2004). Luziferase-Reporteranalysen im *RPS10*-Lokus bestätigten eine Efg1-vermittelte Repression der *SAP2*-Promotoraktivität; bei Anwesenheit von Efg1 wurde eine signifikant (ca. dreifach) niedrigere Reporteraktivität im Vergleich zur *efg1*-Mutante ohne *EFG1* gemessen (Doedt, 2003; diese Arbeit). Wurde statt des 1050 bp-Promotors lediglich die *SAP2p*-Aktivität der 550 bp-Promotorsequenz untersucht, so war - bis auf generell niedrigere Werte - kein Unterschied bezüglich der Aktivität zwischen dem Wildtyp (*EFG1*$^{+}$) und dem *efg1*-Mutantenstamm messbar und somit die Efg1-abhängige Regulation aufgehoben. Aufgrund dieser Tatsachen ließ sich schlussfolgern, dass die stromaufwärts liegende Promotorregion zwischen -550 bp und -1050 bp vom Translationsstart für die *SAP2*-Promotorrepression durch Efg1 verantwortlich sein musste. Die Deletion des im *SAP2*-Promotor einzigen MCB-Elements bei -521 bp zeigte keinen Einfluss auf die *SAP2*-Promotorregulation (Doedt, 2003). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion einer E-Box der Sequenz CAAATG bei -979 bp vom Translationsstart oder der EGR-Kernsequenz ATGCAT bei -588 bp innerhalb des 1050 bp-Promotors ebenfalls keine Auswirkungen auf die Efg1-abhängige Repression der *SAP2*-Promotoraktivität hatte (Abb. 3.15). Weiterhin erbrachte die Deletion des *SAP2*-Promotorbereichs von -1029 bp bis -699 bp (del2) keinen regulatorischen Effekt (Abb. 3.16); durch das Entfernen der für die Efg1-vermittelte Repression verantwortlichen *SAP2*-Promotorregion hätte man eine - ähnlich dem *efg1*-Mutantenstamm - erhöhte Luziferase-Aktivität im Wildtyp-Stamm erwartet. Stattdessen war sogar eine verminderte *SAP2*-Promotoraktiviät in Relation zur vollständigen 1050 bp-Sequenz zu verzeichnen, was auf eine Bedeutung dieser Region für die Grundaktivität des *SAP2*-Promotors weist, jedoch eine Relevanz dieser Region für die *SAP2*-Promotorrepression ausschließen lässt. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich innerhalb der verbleibenden 148 bp großen *SAP2*-Promotorregion zwischen -550 bp und -699 bp wahrscheinlich der Bereich befindet, der für die Efg1-vermittelte Repression des *SAP2*-Promotors wichtig ist. Allerdings kann aufgrund der durchgeführten Deletions-Analysen ausgeschlossen werden, dass die sich in diesem Bereich befindende EGR-Kernsequenz ATGCAT (-588 bp) für die Herabregulation des *SAP2*-Promotors verantwortlich ist. Des Weiteren beinhaltet die 148 bp-Region andere potentielle Efg1-Erkennungssequenzen (ATAATAAT; AAGAAA; AGAAAA), die durch die RSAT-Motivanalyse ermittelt wurden. Eine Deletion des 148 bp-Promotorbereichs würde möglicherweise mehr Klarheit bringen. Es sollte jedoch auch beachtet werden, dass auch innerhalb des *RPS10*-Gens, welches nach der genomischen Integration des *SAP2p-RLUC*-Konstrukts stromaufwärts vom *SAP2*-Promotor liegt, eine EGR-ähnliche Sequenz (TATGCA; 513-518 bp) lokalisiert ist. Denkbar wäre, dass diese die Deletion der EGR-Kernsequenz (-588 bp) im *SAP2*-Promotor kompensiert.

Allerdings muss Efg1 den *SAP2*-Promotor nicht durch direkte eigene Bindung regulieren. Bei der Auswertung der genomweiten ChIP-chip-Daten war weder unter Hefewachstums- noch unter Hypheninduktionsbedingungen eine Efg1-Bindung an den *SAP2*-Promotor feststellbar. Die Tatsache, dass Efg1 an die Promotorbereiche vieler Regulator-Proteine bindet, macht es

wahrscheinlich, dass *SAP2* indirekt durch Efg1 über einen Zwischen-Regulator gesteuert wird. Dieser könnte wiederum auch andere Erkennungssequenzen nutzen.

4.8 Efg1 bindet in der *white*-Zellform an die Promotoren von *WOR1*, *WOR2* und *CZF1*

Bei der Regulation des *white-opaque*-Phänotypwechsels spielen die vier Transkriptionsfaktoren Efg1, Wor1, Wor2 und Czf1 eine bedeutende Rolle (Zordan *et al.,* 2007). Während Efg1 wichtig für die Induktion und Aufrechterhaltung der *white*-Form ist (Sonneborn *et al.,* 1999b; Srikantha *et al.,* 2000), wirken Wor1, Wor2 und Czf1 entgegengesetzt und regulieren die *opaque*-Form positiv (Zordan *et al.,* 2007). So werden die Gene *WOR1, WOR2* und *CZF1* in der *opaque*-Form deutlich stärker transkribiert als im *white*-Zustand, wohingegen *EFG1* in der *opaque*-Form kaum, jedoch stark in der *white*-Form transkribiert wird. Durch die Deletion von *WOR1* wird der *white*-zu-*opaque*-Wechsel unterbunden, während sich eine *WOR1*-Überexpression im massiven Übergang von *white*-Zellen in die *opaque*-Form äußert. Dagegen bewirkt eine Überexpression von *EFG1* in *opaque*-Zellen den Übergang dieser in den *white*-Zustand. Zudem ist auffällig, dass die *efg1*-Mutante morphologisch der *opaque*-Zellform ähnelt, da sie statt der kugelig-runden Hefe- bzw. *white*-Zellform eine leicht längliche Erscheinung besitzt. Der Einfluss von Czf1 auf die *white-opaque*-Regulation äußert sich darin, dass durch die Deletion von *CZF1* die *white*-zu-*opaque*-Switchingfrequenz um den Faktor 10 reduziert wird. Es wird angenommen, dass in *opaque*-Zellen *CZF1* und *WOR2* durch Wor1 induziert werden und als Folge beide Regulatoren die Expression von *WOR1* verstärkt aktivieren. Dabei inhibiert *CZF1* den *opaque*-Repressor *EFG1*, wodurch *WOR2* nicht mehr reprimiert wird und folglich die *WOR1*-Transkription stimulieren kann (Abb. 4.5 A). Darüberhinaus autoreguliert Wor1 die eigene Expression positiv und wirkt auch selbst inhibierend auf *EFG1* (Zordan *et al.,* 2007). Zordan *et al.* (2007) konnten durch ChIP-chip-Analysen zeigen, dass Wor1 in einem *opaque*-Stamm (a/a) an seinen eigenen Promotor bindet sowie an die Stromaufwärtsregionen der ORFs *WOR2, CZF1* und *EFG1*. Interessanterweise zeigen die ChIP-chip-Resultate dieser Arbeit, dass Efg1 in dem genutzten *white*-Stamm (a/α) (HLCEEFG1) nicht nur an die Stromaufwärtsregion von *EFG1* bindet, sondern ebenfalls an die von *WOR1, WOR2* und *CZF1* (unter Hefewachstumsbedingungen); Efg1 scheint also in der *white*-Form die gleichen Gene zu regulieren wie Wor1 in der *opaque*-Zellform. Ein Vergleich der Wor1- und Efg1-Binderegionen innerhalb der Promotoren der vier regulierten Gene ergab auffällige Übereinstimmungen. Innerhalb der Stromaufwärtsregion von *WOR1* konnten zwei HA-Efg1-Binderegionen detektiert werden (-5745 bp bis -5230 bp und -3045 bp bis -2053 bp), die mit den Wor1-Bindebereichen der *opaque*-Form stark überlappen (Abb. 4.4). Allerdings existieren noch weitere Wor1-ChIP-angereicherte Regionen, an welche Efg1 nicht gebunden hat. Im Fall von *WOR2* hat Efg1 den Promotorbereich von -1107 bp bis -726 bp (in Relation zum ATG) gebunden. Diese Region stimmt ebenfalls mit einer Wor1-Bindestelle überein, auch wenn es nicht die stärkste Wor1-angereicherte Region ist. Im *CZF1*-Promotorbereich waren zwei Efg1-Bindepeaks detektierbar, wobei der erste (bei -2257 bp bis -2940 bp) auch mit dem einzigen Wor1-Anreicheungsbereich (ca. -2200 bp bis -3700 bp relativ zum *CZF1*-

ATG) überlappt. Dieser Efg1-Bindebereich wird zudem durch die ChIP-Studien von Vinces *et al.* (2006) zur Bindung von Efg1 an den *CZF1*-Promotor bestätigt. Auch kann Czf1 selbst an diesen Promotorbereich binden (Vinces *et al.,* 2006). Die zweite Efg1-Binderegion innerhalb

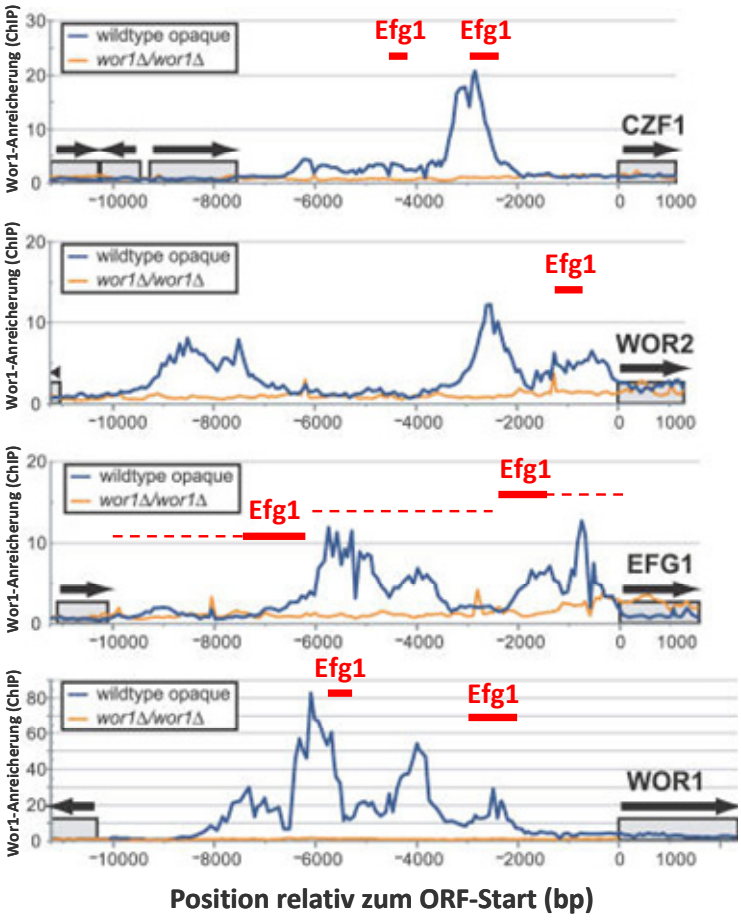


Abb. 4.4: Bindung von Wor1 an die Stromaufwärtsregionen der ORFs *CZF1, WOR2, EFG1* und *WOR1* in der *opaque*-Zellform (a/a). Die Abbildung ist aus der Publikation von Zordan *et al.* (2007) entnommen. Die blaue Linie zeigt die Wor1-Anreicherung entlang der entsprechenden genomischen Regionen in der *opaque*-Zellform. Zum Vergleich sind zusätzlich die Efg1-Binderegionen (rote Striche, rote gestrichelte Linien) der ChIP-chip-Analysen dieser Arbeit, welche unter Hefewachstumsbedingungen in der *white*-Zellform (a/α) auftraten, dargestellt.

des *CZF1*-Promotors befand sich bei -4148 bp bis -4495 bp, wobei hier keine Wor1-Bindung laut den Daten von Zordan *et al.* (2007) vorliegt. Den ChIP-chip-Analysen zufolge kann im Grunde die gesamte Stromaufwärtsregion von *EFG1* als mit Efg1 besetzt interpretiert werden, jedoch heben sich basierend auf zwei von drei ChIP-chip-Replikaten zwei Efg1-Hauptbindebereiche (ca. -6 kb bis -7,4 kb und -1,5 kb bis -2,3 kb) hervor. So überlappt der Efg1-Bindebereich von etwa -2 kb bis -1,5 kb auch mit einer durch Wor1 gebundenen *EFG1*-Promotorregion, wobei die Wor1-Anreicherungsbereiche bei etwa -0,3 kb bis -2 kb (mit einem Hauptpeak bei ca. -0,8 kb relativ zum *EFG1*-ORF) und bei etwa -3,3 kb bis -6 kb

auftreten. Aufgrund der Interaktion von Efg1 mit den Promotoren von *WOR1*, *WOR2* und *CZF1* kann vermutet werden, dass Efg1 die Regulatorgene der *opaque*-Form direkt reprimiert, wenn sich die Zellen in der *white*-Phase befinden (Abb. 4.5 B). Eine zusätzliche Autoaktivierung von *EFG1* - wie für den Hauptregulator der *opaque*-Form Wor1 angenommen wird (Zordan *et al.,* 2007; Abb. 4.5 A) - ist eher auszuschließen, da der Wildtyp (*EFG1*$^{+}$) eine gleich hohe *EFG1*-Promotoraktivität wie die *efg1*-Mutante unter Hefewachstumsbedingungen aufweist (Abb. 3.3).

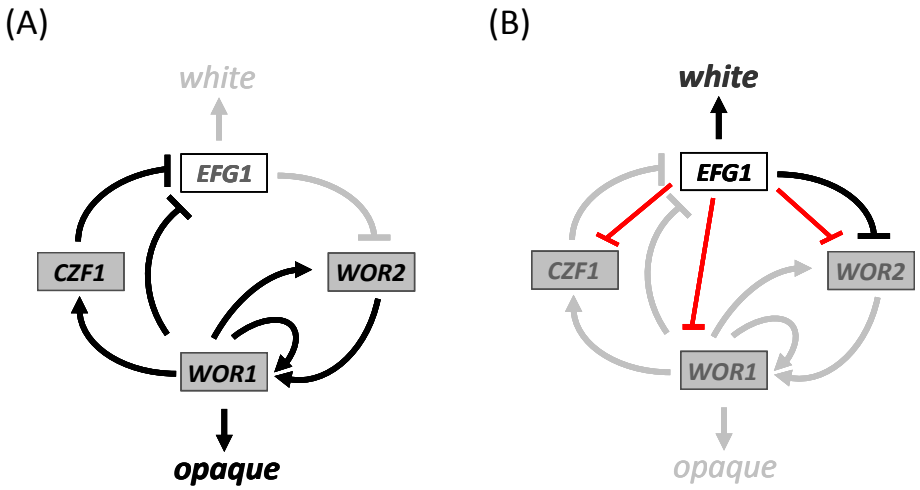


Abb. 4.5: Regulationsschema zum *white-opaque*-Phänotypwechsel in *C. albicans*. Schwarze aktivierende Pfeile und schwarze inhibierende Linien repräsentieren einen aktiven Regulationszustand. Pfeile und Linien in grau verdeutlichen inaktive regulatorische Wechselbeziehungen zwischen *EFG1, WOR2, WOR1* und *CZF1.* **(A)** Regulation in der *opaque*-Zellform. Die Gene *WOR1, WOR2* und *CZF1* sind heraufreguliert. *EFG1* ist herabreguliert. **(B)** Regulation in der *white*-Zellform. *EFG1* ist heraufreguliert. *WOR1, WOR2* und *CZF1* sind herabreguliert. Rote Linien repräsentieren eine mögliche direkte Repression der Gene *WOR1, WOR2* und *CZF1* durch Efg1, wobei die Efg1-Bindungen an die Promotorregionen von *WOR1, WOR2* und *CZF1* auf den ChIP-chip-Ergebnissen (Hefewachstumsbedingungen) dieser Arbeit basieren. Zusätzliche Erläuterungen können dem Text in Abschnitt 4.8 entnommen werden.

4.9 Schlussfolgerungen

Neben der Morphogenese reguliert der Transkriptionsfaktor Efg1 auch den Metabolismus in *C. albicans* (Doedt *et al.,* 2004). Durch genomweite Transkriptomanalysen wurde gezeigt, dass Efg1 nahezu alle Gene der Glykolyse induziert und essentielle Gene des oxidativen Metabolismus unter Hefewachstumskonditionen reprimiert. Aufgrund der fehlenden Bindung von Efg1 an Promotorbereiche dieser Gene kann angenommen werden, dass deren Regulation höchst wahrscheinlich indirekt über zwischengeschaltete Regulatoren durch Efg1 vermittelt wird.

Des Weiteren konnte auch keine signifikante Bindung von Efg1 an die Promotoren früher Zielgene von Efg1, welche in einer transkriptomalen Kurzzeitkinetik mit Hilfe eines induzierbaren Tet-On-Systems identifiziert wurden, festgestellt werden. Diese Gene, die für

Zellwandproteine (z.B. *ECE1*, *ALS10*), für reduzierend wirkende Proteine und weitere Proteingruppen kodieren, waren schon größtenteils eine Minute nach Hypheninduktion heraufreguliert (Stichternoth, 2009). Entweder werden diese Gene indirekt durch Efg1 gesteuert oder aber Efg1 bindet 30 Minuten nach Hypheninduktion schon nicht mehr an die Promotorsequenzen dieser Gene. Denkbar ist eine nur kurz andauernde regulatorische Efg1-Bindung an die Promotoren direkt nach Hypheninduktion, welche im Übrigen auch alle eine EGR- oder zumindest eine EGR-verwandte Sequenz besitzen. Dass die Regulation durch Efg1 generell in einem sehr kleinen Zeitfenster erfolgen kann, wird an der negativen Autoregulation von *EFG1* deutlich.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist ein zentraler Regulator der Morphogenese, des Metabolismus und der Virulenz des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Efg1 reguliert den Dimorphismus, d. h. den Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenwuchsform und steuert dadurch entscheidend die Interaktionen mit den menschlichen Wirtszellen.

Durch Chromatinimmunpräzipitation in Verbindung mit genomweiten Microarrays (ChIP-chip) wurde die chromosomale Efg1-Bindung untersucht. Unter Hefe-Wachstumsbedingungen lokalisierten die Binderegionen überwiegend außerhalb kodierender Genregionen. Die chromosomalen Bindebereiche konnten hauptsächlich Genen zugeordnet werden, die zu den Kategorien Zellmorphologie (hyphales Wachstum, *white-opaque*-Phänotypwechsel) und Regulation der Genexpression gehören. Die Promotoren der Gene *EFG1* und *TCC1* stellten Hauptbinderegionen von Efg1 dar. Weitere Gene, an deren Promotorbereich Efg1 bindet, kodieren sowohl für induzierende als auch für reprimierende Regulatoren der Morphogenese. Basierend auf den Efg1-Binderegionen der ChIP-chip-Analysen und einem *in vitro* DNA-"footprint" wurde das Palindrom TATGCATA als Konsensussequenz für Efg1 ermittelt und als EGR (Efg1 recognition)-Sequenz benannt.

Unerwarteterweise ging unter Hyphen-Induktionsbedingungen die Efg1-Bindung an fast allen EGR-Sequenzen verloren. Bereits 30 Minuten nach Hypheninduktion waren Efg1-Interaktionen mit dem *EFG1*- und *TCC1*-Promotor nicht mehr nachweisbar und es wurden andere chromosomale Bereiche durch Efg1 gebunden als in der Hefeform. Die Efg1-Binderegionen waren jetzt hauptsächlich in kodierenden Bereichen von Genen lokalisiert und es konnten wenigstens fünf verschiedene chromosomale Efg1-Bindesequenzen identifiziert werden, die mit dem EGR-Motiv nicht verwandt sind. Die mit Efg1-Bindestellen assoziierten Gene konnten in keine gemeinsamen funktionellen Kategorien eingruppiert werden, was ein breites Efg1-Regulationsspektrum bei der Hypheninduktion vermuten lässt.

Der schnelle Verlust der Efg1-Bindung am *EFG1*-Promotor korreliert mit dem schnellen Absinken des *EFG1*-Transkriptspiegels bei der Hypheninduktion. Durch Fusionen des *EFG1*-Promotors an das *RLUC*-Reportergen in einer *efg1*-Mutante konnte gezeigt werden, dass Efg1 nicht für die Aktivität des *EFG1*-Promotors in der Hefewachstumsform benötigt wird, sondern für das Absenken des *EFG1*-Transkriptspiegels bei der Hypheninduktion. Diese Fähigkeit von Efg1, den *EFG1*-Promotor zu reprimieren, ist daher nur innerhalb eines kleinen Zeitfensters nach Hypheninduktion möglich. Die damit verbundene Verringerung der *EFG1*-Promotoraktivität wird durch die Tpk2-Isoform der Proteinkinase A (PKA) und den Flo8-Transkriptionsfaktor gesteuert, wie durch die fehlende Regulation in *tpk2*- und *flo8*-Mutanten gezeigt wurde. Die Tpk1-PKA-Isoform ist dagegen für diese Promotorregulation entbehrlich.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung des *EFG1*-Transkriptspiegels für die Hyphenmorphogenese essentiell ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Efg1 bei Hefewachstum durch seine Präsenz an Promotoren von Genen, die die Hyphenbildung steuern, einschließlich *EFG1* und *TCC1,* die Hyphenbildung vorbereitet und dadurch beschleunigt. Die eigentliche *EFG1*-Promotorregulation erfolgt wahrscheinlich über die Phosphorylierung von Efg1 durch die Tpk2-PKA-Isoform und nachfolgende epigenetische Veränderungen.

6 Summary

Efg1 is a central transcriptional regulator of morphogenesis, metabolism and virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. Efg1 regulates the dimorphism, i. e. the switching between yeast and hyphal growth and thus it is crucial for the regulation of the interaction with human host cells.

By combination of chromatin immunoprecipitation and genome-wide microarrays (ChIP chip) the chromosomal Efg1-binding was explored. Under yeast growth conditions the binding sites localized primarily outside of coding regions. The chromosomal binding regions were mainly associated with genes belonging to the categories cell morphology (hyphal growth, *white-opaque*-switching) and regulation of gene expression. The main binding sites of Efg1 were promoters of *EFG1* and *TCC1* genes. Other genes binding Efg1 in their promoter regions are encoding inducers as well as repressors of morphogenesis. Based on Efg1 binding regions determined by ChIP chip and *in vitro* DNA footprint analyses the palindrome TATGCATA was determined as the consensus binding sequence for Efg1, which was designated EGR (Efg1 recognition) sequence.

Unexpectedly, under hyphal induction conditions Efg1 binding to almost all EGR sequences was lost. After only thirty minutes of induction no Efg1 interactions with the *EFG1* and *TCC1* promoters were detectable and different chromosomal regions were bound by Efg1 as compared to the yeast growth form. By this time Efg1 binding regions were mainly located in coding areas of genes and at least five different Efg1 chromosomal binding sequences not related to the EGR motif could be identified. Genes associated with Efg1 binding regions could not be allocated to common functional categories suggesting a wide regulatory spectrum of Efg1 during hyphal induction.

Fast disappearance of Efg1 binding at the *EFG1* promoter correlates with the rapid decline of the *EFG1* transcript level during hyphal induction. By *EFG1* promoter fusions to the *RLUC* reporter gene in an *efg1* mutant it could be shown that Efg1 is not necessary for the activity of the *EFG1* promoter during yeast growth but it is required for the decrease in *EFG1* transcript levels during hyphal induction. Thus, the ability of Efg1 to repress the *EFG1* promoter must occur during a short time window after hyphal induction. The concomitant decrease in *EFG1* promoter activity is controlled by the Tpk2 isoform of protein kinase A (PKA) and by the Flo8 transcription factor, as shown by the missing regulation in *tpk2*- und *flo8*-mutants. In contrast, the PKA isoform Tpk1 is dispensable for this regulation.

In preliminary work it could be shown that the decline in *EFG1* transcript levels is essential for hyphal morphogenesis. The results suggest that during yeast growth Efg1 prepares hyphal development by its presence at the promoters of genes that regulate hyphal development, including *EFG1* and *TCC1*, and thereby accelerates morphogenesis. The actual *EFG1* promoter regulation is probably achieved by phosphorylation of Efg1 by the Tpk2 PKA isoform and subsequent epigenetic alterations.

7 Literaturverzeichnis

Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R., and Metzenberg, R. (1996) *Asm1*$^{+}$, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* **144:** 991-1003.

Atchley, W., and Fitch, W. (1997) A natural classification of the basic helixloop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **94:** 5172-5176.

Bahn, Y. S., and Mühlschlegel, F. (2006) CO_2 sensing in fungi and beyond. *Curr Op in Microbiol* **9:** 572-578.

Banerjee, M., Thompson, D.S., Lazzell, A., Carlisle, P.L., Pierce, C., Monteagudo, C., López-Ribot, J.L., and Kadosh, D. (2008) *UME6*, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell* **19:** 1354-1365.

Bille, J., Marchetti, O., and Calandra, T. (2005) Changing face of health-care associated fungal infections. *Curr Opin Infect Dis* **18:** 314-319.

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

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

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

Borneman, A.R., Hynes, M. J., and Andrianopoulos, A. (2002) A basic helix-loop-helix protein with similarity to the fungal morphological regulators, Phd1p, Efg1p and StuA, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffei*. *Mol Microbiol* **44:** 621-631.

Braun, B.R., and Johnson, A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1. Science* **277:** 105-109.

Braun, B.R., Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J* **20:** 4753-4761.

Brown, A.J., and Gow, N.A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7:** 333-338.

Brown, D.H. Jr., Giusani, A.D., Chen, X., and Kumamoto, C.A. (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol Microbiol* **34:** 651-662.

Bruno, V.M, Wang, Z., Marjani, S.L., Euskirchen, G.M., Martin, J., Sherlock, G., and Snyder, M. (2010) Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome Res* **20:** 1451-1458.

Buck, M. J., and Lieb, J.D. (2004) ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* **83:** 349–360.

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

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

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

Cao, F., Lane, S., Raniga, P.P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., Chen, J., and Liu, H. (2006) The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17:** 295-307.

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

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

Catron, K.M., Iler, N., and Abate, C. (1993) Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* **13:** 2354-2365.

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

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

Court, H., and Sudbery, P. (2007) Regulation of Cdc42 GTPase activity in the formation of hyphae in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **18:** 265-281.

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

Davuluri, R.V., Suzuki, Y., Sugano, S., Zhang, M.Q. (2000) CART classification of human 5´ UTR sequences. *Genome Res* **10:** 1807-1816.

Dignard, D., El-Naggar, A.L., Logue, M.E., Butler, G., and WhitewayI, M. (2007) Identification and characterization of *MFA1*, the gene encoding *Candida albicans* a-factor pheromone. *Eukaryot Cell* **6:** 487-494.

Doedt, T. (2003) Transkriptionelle Steuerung von Morphogenese und Metabolismus des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch die APSES-Proteine Efg1p und Efh1p. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

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

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

Dujardin, L., Walbaum, S., and Biguet, J. (1980a) Chlamydosporulation in *Candida albicans.* Course of the morphogenesis; influence of light and sowing density. *Ann Microbiol* (Paris) **131A:** 141-149.

Dujardin, L., Walbaum, S., and Biguet, J. (1980b) Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydospores in synthetic culture media. *Mycopathologia* **71**: 113-118.

Dumitru, R., Navarathna, D.H., Semighini, C.P., Elowsky, C.G., Dumitru, R.V., Dignard, D., Whiteway, M., Atkin, A.L., and Nickerson, K. W. (2007) *In vivo* and *in vitro* anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6:** 465-472.

Dutton, J.R., Johns, S., and Miller, B.L. (1997) StuA is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **16:** 5710-5721.

Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., and Wenzel, R. P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a threeyear analysis. *Clin Infect Dis* **29:** 239-244.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. (1994) Crystal structure of transcription factor E47: E-Box recognition by a basic region Helix-Loop-Helix dimer. *Genes Dev* **8:** 970-980.

Ernst, J. F., and Tielker, D. (2009) Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell Microbiol* **11:** 183-190.

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

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

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

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

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the Efg1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44:** 61-72.

García-Pedrajas, M.D., Baeza-Montañez, L., Gold, S.E. (2010) Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES domain. *Mol Plant Microbe Interact* **23:** 211-222.

Ghannoum, M.A., Jurevic, R.J., Mukherjee, P.K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., and Gillevet, P.M. (2010) Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PloS Pathog* **6:** e1000713.

Giardina, C., and Lis, J.T. (1995) Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. *Mol Cell Biol* **15:** 2737-2744.

Gimeno, C.J., and 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., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and Ras. *Cell* **68:** 1077-1090.

Giusani, A.D., Vinces, M., and Kumamoto, C.A. (2002) Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* **160:** 1749-1753.

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

Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L. and Amati, B. (2006) Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* **8:** 764-770.

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

Hilbig, J. (2004) Untersuchungen zur DNA-Bindespezifiät des morphologischen Regulators Efg1p des humanpathogene Pilzes *Candida albicans. Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh, S.H., and Zhao, X. (2007) Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (*ALS*) gene family - a sticky pursuit. *Med Mycol* **46:** 1-15.

Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M., and Scherer, S. (1998) *Candida albicans ALS3* and insights into the nature of the *ALS g*ene gamily. *Curr Genet* **33:** 451-459.

Hurlin, P.J., Ayer, D.E., Grandori, C., and Eisenman, R.N. (1994) The Max transcription factor network: involvement of Mad in differentiation and an approach to identification of target genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59:** 109-16.

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

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

Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2001) Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **21:** 2496-2505.

Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell* **16:** 2903-2912.

Kaneko, A., Umeyama, T., Utena-Abe, Y., Yamagoe, S., Niimi, M., and Uehara, Y. (2006) Tcc1p, a novel protein containing the tetratricopeptide repeat motif, interacts with Tup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5:** 1894-1905.

Kennelly, P.J., and Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **266:** 15555-15558.

Khalaf, R.A., and Zitomer, R.S. (2001) The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **157:** 1503-1512.

Kim, S., Wolyniak, M.J., Staab, J.F., and Sundstrom, P. (2007) A 368-base pair cis-acting *HWP1* promoter region, HCR, of *Candida albicans* confers hypha-specific gene regulation and binds architectural transcription factors Nhp6 and Gcfp. *Eukaryot Cell* **6:** 693-709.

Klengel, T., Liang, W.J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J., Eckert, S.E., Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., Levin, L.R., Buck, J., and Mühlschlegel, F. (2005) Fungal adenylyl cyclases integrates CO_2 sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* **15:** 2021-2026.

Koch, C., and Nasmyth, K. (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol.* **6:** 451-459.

Kolotila, M.P., and Diamond, R.D. (1990) Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect Immun* **58:** 1174-1179.

Kumamoto C. A., and Vinces M. D. (2005) Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* **59:** 113-133.

Kurtz, D. (2010) Biochemische und genetische Untersuchungen des Transkriptionsregulators Efg1 aus *Candida albicans. Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität.

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

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

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

Lackner, D.H., Beilharz, T.H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert. F., Preiss, T. and Bähler, J. (2007) A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol Cell* **26:** 145-155.

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

Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W., and Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99:** 14907-14912.

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

Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R., and Liu, H. (2001) DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans. J Biol Chem* **276:** 48988-48996.

Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R., and Liu, H. (2001) DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **276:** 48988-48996.

Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q., and Liu, H. (2001) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via *TEC1*. *Mol Cell Biol* **21:** 6418-6428.

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

Ledent, V., and Vervoort, M. (2001) The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res* **11:** 754-770.

Leng, P., Lee, P.R., Wu, H., and Brown, A.J.P. (2001) Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* **183:** 4090-4093.

Leuker, C.E., and 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.

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

Lloyd, A.T., and Sharp, P.M. (1992) Evolution of codon usage patterns: the extent and nature of divergence between *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res* **20:** 5289-5295.

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

Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Zhao, R., Wessels, D., and Soll, D.R. (2003) Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2:** 49-61.

Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., and Soll, D.R. (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162:** 737-745.

Lorenz, M.C., Bender, J.A., and Fink, G.R. (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3:** 1076-1087.

Lu, Y., Su, C., Mao, X., PalaRaniga, P., Liu, H., and Chen, J. (2008) Efg1-mediated recruitment of NuA4 to promoters is required for hypha-specific Swi/Snf binding and activation in *Candida albicans. Mol Biol Cell* **19:** 4260-4272.

Lu, Y., Su, C., Wang, A., and Liu, H. (2011) Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS Biol* **9:** e1001105.

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

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

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

Martin, R., Moran, G.P., Jacobsen, I.D., Heyken, A., Domey, J., Sullivan, D.J., Kurzai, O., and Hube, B. (2011) The *Candida albicans*-specific gene *EED1* encodes a key regulator of hyphal extension. *PLoS ONE* **6:** e18394.

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

McCullough, M.J., Ross, B.C., and Reade, P.C. (1996) *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiologc, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* **25:** 136-144.

Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.

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

Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaia, F., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F.C., and Brown, A.J. (2001) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20:** 4742-4752.

Naglik, J.R., Challacombe, S.J., and Hube, B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67:** 400-428.

Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A.-P., Sensen, C.W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D. C., Thomas, D. Y., and Whiteway, M. (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mo. Biol Cell* **13:** 3452-3465.

Noffz, C.S., Liedschulte,V. Lengeler,K., and Ernst, J.F. (2008) Functional mapping of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Eukaryot Cell* **7:** 881-893.

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

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

Park, H., Myers, C.L., Sheppard, D.C., Phan, Q.T., Sanchez, A.A., Edwards J.E., and Filler, S.G. (2005) Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* **7:** 499-510.

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

Pfaller, M.A., Jones, R., Doern, G., Fluit, A. Verhoef, J., Sader, H., Messer, S., Houston, A. Coffmann, S., and Hollis, R. (1999) International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY-Programm: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazol and echinocandin agents. *Diagn Microbiol. Infect Dis* **35:** 19-25.

Pokholok, D.K., Zeitlinger, J., Hannett, N.M., Reynolds, D.B. and Young, R.A. (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* **313:** 533-536.

Ramage, G., VandeWalle, K., López-Ribot, J. L. and Wickes, B. L. (2002) The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **214:** 95-100.

Rikkerink, E.H., Magee, B.B., and Magee, P.T. (1988) Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **170:** 895-859.

Robertson, L.S., and Fink, G.R. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **95:** 13783-13787.

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

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

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

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

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

Schröppel, K., Sprosser, K., Whiteway, M., Thomas, D.Y., Rollinghoff, M., and Csank, C. (2000) Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun* **68:** 7159-7161.

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Röllinghoff, M., and Schröppel, K. (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38:** 435-445.

Sellam, A., Hogues, H., Askew, C., Tebbji, F., van Het Hoog, M., Lavoie, H., Kumamoto, C.A., Whiteway, M. and Nantel, A. (2010) Experimental annotation of the human pathogen *Candida albicans* coding and noncoding transcribed regions using high-resolution tiling arrays. *Genome Biol* **11:** R71.

Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., and Ernst, J.F. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361:** 399-411.

Sharkey, L.L., McNemar, M.D., Saporito-Irwin, S.M., Sypherd, P.S., and Fonzi, W.A. (1999). *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1, TUP1,* and *RBF1*. *J Bacteriol* **181:** 5273-5279.

Sinha, I., Wang, Y.M., Philp, R., Li, C.R., Yap, W.H., and Wang, Y. (2007) Cyclin-dependent kinases control septin phosphorylation in *Candida albicans* hyphal development. *Dev Cell* **13:** 421-432.

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

Sobel, J. D. (1997) Vaginitis. *N Engl J Med* **337:** 1896-1903.

Sonneborn, A. (1999) Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Efg1p und der Proteinkinase A (Catpk2p) für die Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., and Ernst, J.F. (1999a) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67:** 5514-5517.

Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., and Ernst, J.F. (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35:** 386-396.

Sonneborn, A., Tebarth, B., and Ernst, J.F. (1999b) Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67:** 4655-4660.

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

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

Stichternoth, C., and Ernst, J.F. (2009) Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **75:** 3663-3672.

Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E., and Ernst, J.F. (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human fungal pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16:** 1982-1991.

Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12:** 317-24.

Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* Spp. *Cell Microbiol* **4:** 461-469.

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

Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A., and Ernst, J.F. (2003) Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *J Mol Biol* **329:** 949-962.

Thukral, S.K., Eisen, A., and Young, E.T. (1991) Two monomers of yeast transcription factor ADR1 bind a palindromic sequence symmetrically to activate *ADH2* expression. *Mol Cell Biol* **11:** 1566-1577.

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

Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* **115:** 389-399.

Van Helden, J. (2003) Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **31:** 3593-3596.

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

Vinces, M.D., Haas, C., and Kumamoto, C.A. (2006) Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene *CZF1* and its regulation by Efg1p and Czf1p. *Eukaryot Cell* **5:** 825-835.

Wang, A., Lane, S., Tian, Z., Sharon, A., Hazan., I., and Liu, H. (2007) Temporal and spatial control of *HGC1* expression results in Hgc1 localization to the apical cells of hyphae in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6:** 253-261.

Wang, A., Raniga, P. P., Lane, S., Lu, Y., and Liu, H. (2009) Hyphal chain formation in *Candida albicans*: Cdc28-Hgc1 phosphorylation of Efg1 represses cell separation genes. *Mol Cell Biol* **16:** 4406-4416.

Wang, Y. (2009) CDKs and the yeast-hyphal decision. *Curr Opin Microbiol* **12:** 644-649.

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

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

Wilson, R.B., Davis, D., and Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181:** 1868-1874.

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

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

Zakikhany, K., Naglik, J.R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., and Hube, B. (2007) In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol* **9:** 2938-2954.

Zeidler, U., Lettner, T., Lassnig, C., Müller, M., Lajko, R., Hintner, H., Breitenbach, M., and Bito, A. (2009) *UME6* is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. FEMS *Yeast Res* **9:** 126-142.

Zheng, X., Wang, Y., and Wang, Y. (2004) Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J* **23:** 1845-1856.

Zheng, X.D., Lee, R.T., Wang, Y.M., Lin, Q.S., and Wang, Y. (2007) Phosphorylation of Rga2, a Cdc42 GAP, by CDK/Hgc1 is crucial for *Candida albicans* hyphal growth. *EMBO J* **26:** 3760-3769.

Znaidi, S., Barker, K.S., Weber, S., Alarco, A.M., Liu, T.T., Boucher, G., Rogers, P.D., and Raymond M. (2009) Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot Cell* **8:** 806-820.

Zordan, R.E., Miller, M.G., Galgoczy, D.J., Tuch, B.B., and Johnson, A.D. (2007) Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol* **5:** e256.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
ARS	autonomous replication site (autonom replizierende Sequenz)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca	*Candida albicans*
C. albicans	*Candida albicans*
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
C-terminal	carboxyterminal
dH_2O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EGR	Efg1 recognition (EGR-Box)
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	ß-Galaktosidase-Gen aus *E. coli*
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
LiAc	Lithiumacetat

log	logarithmisch
M	Molar
MAP	mitogen activated protein
Mbp	Megabasenpaare
MCB	*Mlu*I cell cycle box
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTL	mating-type-like locus
N	variable DNA-Base
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-terminal	aminoterminal
$OD_{600\ nm}$	optische Dichte bei 600 nm
$OD_{595\ nm}$	optische Dichte bei 595 nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p.a.	per analysis
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pers.	persönlich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Ionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonyl Fluorid
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	messanger RNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTL	relativer Transkript Level
s.	siehe
sat1	Markergen (N-Acetyltransferase); vermittelt Resistenz gegen Nourseothricin
Sc	*Saccharomyces cerevisiae*
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SD	synthetisches Minimalmedium mit Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
ss	Einzelstrang
SSC	standard saline citrate
T	Thymidin
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TWEEN	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
UTR	untranslated region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
YCB	Yeast carbon base
YNB	Yeast nitrogen base (Hefe Stickstoffbasis)
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren:

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

Tab. 9.1: Bindung von Efg1 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* unter Hefewachstumsbedingungen.

Chr	Binderegion (Position)	Größe (bp)	5´-ORF	Genname	Efg1-reguliert	5´-ORF-Position/Orientierung	3´-ORF	Genname	Efg1-reguliert	3´-ORF-Position / Orientierung
1	231114-232810	1697	*orf19.3302*		a	229788-227686 <---	*orf19.3303*			234943-232874 <---
1	293441-295123	1683	*orf19.3335*		b	291860-292462 --->	*orf19.3336*			296059-296517 --->
1	445470-445927*	458	*orf19.3669*	*SHA3*	b	444259-442472 <---	*orf19.3670*	*GAL1*	a,b	450824-449277 <---
1	456045-456834	790	*orf19.3674*	*GAL102*		455845-454883 <---	*orf19.3675*	*GAL7*		456773-457933 --->
1	817788-818438	651	*orf19.4459*			815640-813949 <---	*orf19.4461*			821342-820980 <---
1	1086431-1087219	789	*orf19.450*			1085239-1085006 <---	*orf19.449*		a,b	1093862-1092666 <---
1	1088082-1089435	1354	*orf19.450*			1085239-1085006 <---	*orf19.449*		a,b	1093862-1092666 <---
1	1090117-1091552	1436	*orf19.450*			1085239-1085006 <---	*orf19.449*		a,b	1093862-1092666 <---
1	2187171-2188297	1127	*orf19.4866*	*CPP1*		2185137-2183344 <---	*orf19.4867*	*SWE1*		2192696-2189160 <---
1	2224792-2225307	516	*orf19.4883*			2220202-2217971 <---	*orf19.4884*	*WOR1*		2230537-2232894 --->
1	2227492-2228484*	993	*orf19.4883*			2220202-2217971 <---	*orf19.4884*	*WOR1*		2230537-2232894 --->
2	162595-164419	1823	*orf19.2024*			163117-163476 --->	*orf19.2023*	*HGT7*	b	164467-166107 --->
2	731176-732822	1647	*orf19.871*			728433-731492 --->	*theta-2a (LTR)*			734881-735247 --->
2	735752-735988*	237	*theta-2a (LTR)*			734881-735247 --->	*orf19.868*	*ADAEC*	b	742466-740829 <---
2	738030-740049	2020	*theta-2a (LTR)*			734881-735247 --->	*orf19.868*	*ADAEC*	b	742466-740829 <---
3	855453 (856150)-856459	1007 (310)	*orf19.913.2*		b	855057-855583 --->	*orf19.5854*	*SBP1*		856950-857798 --->
3	955828-956354 (956098)	527 (271)	*orf19.5908*	*TEC1*		952102-949871 <---	*orf19.5910*			960450-958171 <---
3	1117727-1118108	382	*orf19.5991*			1107792-1105066 <---	*orf19.5992*	*WOR2*		1118834-1120174 --->
3	1124628-1125842	1215	*orf19.5992*	*WOR2*	a	1118834-1120174 --->	*orf19.5994*	*RHB1*		1126577-1127131 --->
3	1222358-1223472	1115	*orf19.6983*			1217361- 1216189 <---	*orf19.6984*		b	1226769-1229057 --->
3	1356793-1357761	969	*orf19.7380*		a	1352463-1349947 <---	*orf19.7381*	*AHR1*	a,b	1362621-1364495 --->
3	1359342-1360389	1048	*orf19.7380*		a	1352463-1349947 <---	*orf19.7381*	*AHR1*	a,b	1362621-1364495 --->
3	1472387-1476744	4358	*tH(GUG)3*	*tRNA-His*		1469714-1469617 <---	*orf19.7436*	*AAF1*		1477307-1479145 --->
3	1721702-1723247	1546	*orf19.6736*			1721337-1719448 <---	*orf19.6734*	*TCC1*	a	1730058-1732304 --->
3	1727230-1729168	1939	*orf19.6736*			1721337-1719448 <---	*orf19.6734*	*TCC1*	a	1730058-1732304 --->
3	1729861-1730614*	754	*orf19.6736*			1721337-1719448 <---	*orf19.6734*	*TCC1*	a	1730058-1732304 --->
3	1759352-1759818	467	*orf19.6715*			1758277-1757969 <---	*orf19.6713*			1761920-1763125 --->
4	575032-575722	691	*orf19.2724*			571922-573418 --->	*orf19.2723*	*HIT1*		577406-577852 --->
4	1099756-1100357	602	*orf19.740*	*HAP41*	a	1099281-1097336 <---	*orf19.741*			1104710-1104396 <---
4	1425356-1425922	567	*orf19.2893*			1421029-1423566 --->	*orf19.2892*			1426618-1429254 --->
4	1469945-1470654	710	*orf19.2877*	*PDC11*	b	1469944-1468241 <---	*orf19.2876*	*CBF1*	b	1471203-1472237 --->
4	1522575-1523258	684	*orf19.3127*	*CZF1*		1520318-1519161 <---	*orf19.3126*	*CCT6*		1529615-1527936 <---
4	1524466-1524813	348	*orf19.3127*	*CZF1*		1520318-1519161 <---	*orf19.3126*	*CCT6*		1529615-1527936 <---
5	236648-237216	569	*orf19.1961*			236456-234864 <---	*(orf19.1960)*	*CLN3*		245611-244214 <---
6	89963-91261	1299	*orf19.4211*	*FET3*	a	89365-87506 <---	*orf19.4210*			92713-94104 --->
6	128712-129248	537	*orf19.3655*			126597-128513 --->	*orf19.3653*	*FAT1*		129850-131802 --->
6	173735-174386	652	*orf19.89*	*PEX7*		172306-173448 --->	*orf19.90*			174667-176931 --->
6	765220-766340	1119	*orf19.5728*			764938-763358 <---	*orf19.5729*	*FGR17*		767847-769811 --->
7	108958-112417	3460	*orf19.7055*			106646-106320 <---	*orf19.7054*			114110-114475 --->

7	114102-115127	1026	*orf19.7054*			114110-114475 --->	*orf19.7053*	*GAC1*		115894-117909 --->
7	445032-446831	1800	*orf19.6515*	*HSP90*		439531-441654 --->	*orf19.6514*	*CUP9*	a	450910-449876 <---
7	447291-448022*	731	*orf19.6515*	*HSP90*		439531-441654 --->	*orf19.6514*	*CUP9*		450910-449876 <---
7	448208-449086*	879	*orf19.6515*	*HSP90*		439531-441654 --->	*orf19.6514*	*CUP9*		450910-449876 <---
7	451315-451703	389	*orf19.6514*	*CUP9*	a	450910-449876 <---	*orf19.6512*	*EXO70*		457369-455366 <---
7	453194-453941	748	*orf19.6514*	*CUP9*	a	450910-449876 <---	*orf19.6512*	*EXO70*		457369-455366 <---
7	909151-910416	1266	*orf19.7152*			908685-907588 <---	*orf19.7151*			915533-915967 --->
7	916987-917813	827	*orf19.7151*			915533-915967 --->	*orf19.7150*	*NRG1*	b	918848-919780 --->
7	917841-918075*	235	*orf19.7151*			915533-915967 --->	*orf19.7150*	*NRG1*	b	918848-919780 --->
R	79241-79948	708	*orf19.7502*			76707-75931 <---	*orf19.7501*			83460-82153 <---
R	338649-339041	393	*orf19.2529.1*			338318-338130 <---	*tL(UAA)2*	*tRNA-Leu*		339612-339497 <---
R	589369-590458	1090	*orf19.2822*			586101-585256 <---	*orf19.2823*	*RFG1*		600293-602095 --->
R	592291-593487*	1197	*orf19.2822*			586101-585256 <---	*orf19.2823*	*RFG1*		600293-602095 --->
R	597243-598742	1500	*orf19.2822*			586101-585256 <---	*orf19.2823*	*RFG1*		600293-602095 --->
R	602625-603201	577	*orf19.2823*	*RFG1*		600293-602095 --->	*orf19.2825*		a	610363-609134 <---
	607023-607781	759	*orf19.2823*	*RFG1*		600293-602095 --->	*orf19.2825*		a	610363-609134 <---
R	894567-895105	539	*orf19.474*			894237-892936 <---	*orf19.475*			894751-895851 --->
R	1311977-1313733	1757	*orf19.3867*	*RPL7*		1308722-1309609 --->	*orf19.3868*			1316235-1315882 <---
R	1314544-1316325	1780	*orf19.3867*	*RPL7*		1308722-1309609 --->	*orf19.3868*			1316235-1315882 <---
R	1525920-1526545	626	*orf19.2356*	*CRZ2*		1525254-1523701 <---	*(orf19.1816)*	*ALS3*		1535813-1532346 <---
R	1527515-1527944*	430	*orf19.2356*	*CRZ2*		1525254-1523701 <---	*(orf19.1816)*	*ALS3*		1535813-1532346 <---
R	1529050-1529324*	275	*orf19.2356*	*CRZ2*		1525254-1523701 <---	*(orf19.1816)*	*ALS3*		1535813-1532346 <---
R	1716206-1717670	1465	*orf19.612/tG(GCC)1*			1712520-1713512 --- >/1713758-1713688 <---	*orf19.610*	*EFG1*		1723589-1725166 --->
R	1721195-1722078	884	*orf19.612/tG(GCC)1*			1712520-1713512 --- >/1713758-1713688 <---	*orf19.610*	*EFG1*		
R	1725278-1725903	626	*orf19.610*	*EFG1*		1723589-1725166 --->				
R	2105527-2105857	331	*kahu-Rb (LTR)*			2103918-2103388 <---	*orf19.7561*	*DEF1*		2106215-2108878 --->
R	2110266-2110645	380	*orf19.7561*	*DEF1*	a	2106215-2108878 --->	*orf19.7563*	*BET2*		2114062-2113037 <---
R	2168362-2170345	1984	*orf19.7590 / **titi-Ra (LTR)***			2165996-2168158 ---> / 2169610-2169275 <---	*orf19.7592*	*FAA4*		2172618-2174708 --->

Der HA-Efg1 produzierende Stamm HLCEEFG1 wurde in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{600} = 1 in der Hefeform angezogen. Als Kontrolle diente der Stamm DSC11 ohne HA-Epitop. Chromosomal gebundene Proteine wurden mit Formaldehyd fixiert. Das Chromatin wurde isoliert, mittels Sonifikation fragmentiert und HA-Efg1 gebundene Fragmente wurden mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die DNA-Präzipitate beider Stämme wurden unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans*-Genom-Tiling-Microarray kohybridisiert. Aufgelistet sind HA-Efg1 gebundene signifikante (FDR ≤ 0,05) chromosomale Regionen (Chromosom (Chr) 1 - 7, R) mit den zur Binderegion nächstpositionierten 5´- und 3´-ORFs. Türkise Schrift kennzeichnet eine Efg1-Bindung innerhalb der entsprechenden kodierenden Regionen. Gelbe Unterlegungen verdeutlichen das mehrfache Auftreten gleicher Stromauf- bzw. Stromabwärts-ORFs. Eine Markierung durch Sternchen * zeigt an, dass die Binderegionen auf 2 (anstatt auf 3) unabhängigen ChIP-chip-Replikaten basieren. Anzumerken ist, dass lediglich die Efg1-Hauptbindepeakregionen innerhalb des *EFG1*-Promotors (Chr R) aufgelistet sind, da die Binderegion in dem dritten ChIP-Array-Ergebnis mehr als 10 kb umfasst. In Transkriptomstudien ermittelte Efg1-regulierte Gene sind durch **a.** Doedt *et al.* (2004) und durch **b.** Setiadi *et al.* (2006) gekennzeichnet.

Tab. 9.2: Bindung von Efg1 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* während der Hypheninduktion.

Chr	Binderegion (Position)	Größe (bp)	5´-ORF	Gen-name	Efg1-reguliert	5´-ORF-Position/ Orientierung	3´-ORF	Gen-name	Efg1 - reguliert	3´-ORF-Position/ Orientierung
1	11844-12202 *	359	*orf19.6110*			11995-11648 <---	*orf19.6109*	*TUP1*		12163-13701 --->
1	495670-496473	803	*orf19.3694*			496257-492625 <---	*(orf19.2925)*			498993-498391 <---
1	797332-797896	565	*orf19.1030/ orf19.1029*			796893-795613 <--- / 797227-798159 --->	*orf19.1028*			799429-798251 <---
1	1317626-1318634 *	1009	*orf19.1822*	*UME6*		1317025-1314494 <---				
1	1593140-1593297	158	*orf19.4433*	*CPH1*		1592574-1590604 <---	*orf19.4432*	*KSP1*		1598119-1595267 <---
1	1672176-1675496	3321	*orf19.1229*			1672965-1669828 <---	*orf19.1232*	*VRG4*	b	1675356-1674241 <---
1	2353811-2355258	1448	*orf19.1833*			2352602-2354041 --->	*orf19.1834*			2356937-2354205 <---
1	2363781-2364311	531	*orf19.1837*	*TBP1*	a	2362662-2363378 --->	*orf19.1839*	*RPA190*		2369345-2364348 <---
1	2679839-2680081	243	*orf19.5235*		a	2680237-2679539 <---	*orf19.5234*	*RBD1*		2682643-2680634 <---
2	224456-226343	1888	*orf19.1994*			223605-225650 --->	*orf19.1993*			226014-227255 --->
2	422847-424624	1778	*orf19.1531/ orf19.1532*			422123-419748 <---/ 422927-423997 --->	*orf19.1533*			425071-426447 --->
2	671518-672015	498	*orf19.906*	*ROM2*		669665-665520 <---	*orf19.905*	*AVT7*		672821-674143 --->
2	774499-775144	646	*orf19.853*	*SAP99*	b	773182-774273 --->	*orf19.852*	*SAP98*		775519-776613 --->
2	969454-971717	2264	*iota-2a (LTR)*			969358-969607 --->	*orf19.144*	*SNU114*	a	974872-971804 <---
2	1024676-1024944	269	*beta-2a (LTR)*			1024586-1024155 <---	*orf19.3522*			1026295-1026600 --->
2	1345343-1345697	355	*orf19.35.1*			1345445-1345203 <---	*orf19.36*			1347014-1348291 --->
2	1347414-1348134	721	*orf19.36*			1347014-1348291 --->				
2	1355794-1357469	1676	*orf19.1296*			1356380-1354671 <---	*orf19.81*			1356640-1357449 --->
2	1991096-1992208	1113	*orf19.1376*			1989931-1990818 --->	*orf19.1375*	*LEU42*		1992242-1993957 --->
2	2033393-2034856	1464	*orf19.1358*	*GCN4*		2031301-2032272 --->	*orf19.1357*	*FCY21*		2034842-2036386 --->
2	2037221-2038342	1122	*orf19.1356*		b	2036830-2037837 --->	*orf19.1355*			2039304-2038261 <---
2	2039626-2040679 *	1054	*orf19.1355*			2039304-2038261 <---	*orf19.1785*		b	2041670-2042650 --->
2	2079797-2084499	4703	*orf19.1768/ orf19.1767*			2077093-2080227 --->/ 2081249-2083090 --->	*orf19.1766*		b	2084490-2085695 --->
2	2096442-2097373	932	*orf19.1761*		a	2095818-2096333 --->	*orf19.1760*	*RAS1*		2097593-2096718 <---
2	2138658-2139197	540	*orf19.1742*	*HEM3*		2138454-2137432 <---	*MRS-2*			2141700-2155693 --->
3	291563-292321	759	*orf19.1716*	*URA3*	b	291144-290332 <---	*orf19.1715*	*IRO1*	a	293370-291580 <---
3	307077-309275	2199	*orf19.1708/ orf19.1707*		b/	306822-307481 --->/ 307957-307640 <---	*orf19.1706*	*MET18*		311242-307973 <---
3	309883-310983 *	1101	*orf19.1706*	*MET18*		311242-307973 <---				
3	520448-524462	4015	*orf19.1607/ rho-3c (LTR)*	*ALR1/*		520517-517728 <---/521813-521537 <---	*orf19.1606*			524220-525845 --->
3	591470-592715	1246	*orf19.264/ tF(GAA)1/ tR(UCU)1*			590522-591874 --->/ 592105-592018 <---/ 592186-592114 <---	*orf19.265*			593880-595382 --->
3	1165017-1166964	1948	*orf19.6008*			1166751-1163926 <---	*orf19.6966*			1170278-1168410 <---
3	1795109-1795337	229	*orf19.6191*	*TLO8*		1788223-1787714 <---	*orf19.6192*		a	1796319-1795918 <---
4	164784-165240	457	*tG(GCC)5*			164170-164100 <---	*orf19.4703*			166832-165126 <---
4	322662-323823	1162	*orf19.4629*			324742-321845 <---				
4	517251-520432	3182	*orf19.2749/ orf19.2748*	*/ARG83*	b/	515620-514148 <---/ 517410-520334 --->	*orf19.2747*	*RGT1*		523970-527059 --->
4	525462-527826	2365	*orf19.2747*	*RGT1*		523970-527059 --->	*orf19.2746*			529387-527495 <---

4	820845-821656	812	*orf19.5041*			821011-819938 <---	*orf19.5042*			821859-821221 <---
4	1130387-1132971	2585	*orf19.6861*			1132050-1129654 <---	*orf19.6862*		b	1134550-1132241 <---
4	1156657-1158300	1644	*orf19.1290*	*XKS1*		1154756-1156606 --->	*orf19.1789*			1156891-1158354 --->
4	1158314-1160687 *	2374	*orf19.1789/ orf19.1789.1*	*/LYS1*		1156891-1158354 --->/ 1159049-1160197 --->	*orf19.1791*		b	1161801-1160326 <---
5	230913-233396	2484	*orf19.1963*	*GDS1*		231072-229549 <---	*orf19.1961*			236456-234864 <---
5	385189-387356	2168	*orf19.3205/ orf19.3204*			384458-385090 --->/387527-385311 <---	*orf19.3203*	*RCY1*		390336-387781 <---
5	578336-578725	390	*orf19.4273*			579346-576587 <---				
5	580779-583251 *	2473	*orf19.4273/ orf19.4274*	*/PUT1*		579346-576587 <---/ 580957-582426 --->	*orf19.4275*	*RAD9*		586193-582669 <---
5	866766-867035	270	*orf19.3218*		a	865191-863725 <---	*orf19.3216*			868715-871219 --->
5	870742-874097	3356	*orf19.3216/ orf19.3215*			868715-871219 --->/ 872183-872572 --->	*orf19.3214*			873713-875197 --->
5	888194-888583	390	*orf19.3210*			883072-882434 <---	*orf19.3209*	*FGR42*		889682-889368 <---
5	886451-887213 *	763	*orf19.3210*			883072-882434 <---	*orf19.3209*	*FGR42*		889682-889368 <---
5	890980-893227 *	2248	*orf19.3209/ orf19.1287*	*FGR42/*		889682-889368 <---/ 891567-892709 --->	*orf19.1286*			896840-896484 <---
6	288860-292169	3310	*orf19.3440/ orf19.3439*	*FRP5/*		288351-287518 <---/ 290450-289497 <---	*orf19.3438*			293962-292808 <---
6	322424-322626	203	*orf19.3429*	*FGR47*		324463-321539 <---				
6	719716-720289	574	*orf19.5701*			718017-720212 --->	*orf19.5702*			725138-720336 <---
6	894213-896159	1947	*orf19.1210*			892798-894330 --->	*orf19.4557*			897768-894484 <---
7	152786-153140	355	*orf19.7038*		a	150850-153243 --->	*orf19.7037*	*YAE1*		153889-153347 <---
7	483465-483796	332	*orf19.6493*		b	483239-483631 --->	*orf19.6492*			485036-483810 <---
7	485640-486583	944	*orf19.6492*			485036-483810 <---	*orf19.6491*			486519-486872 --->
7	547210-547459	250	*orf19.6456*			545768-547444 --->	*orf19.6455*		a	548338-547670 <---
R	351412-352828	1417	*orf19.2538*	*PTC2*		349638-351389 --->	*orf19.2539*			353276-352941 <---
R	585556-586428	873	*orf19.2822*			586101-585256 <---				
R	1013190-1013348	159	*orf19.554*	*DIT2*		1013148-1011985 <---	*orf19.1741*	*DIT1*		1014172-1015698 --->
R	1031697-1032844	1148	*orf19.6317/ orf19.6316.4*	*ADE6/*		1031590-1027478 <---/ 1032134-1032400 --->	*orf19.6316*			1034479-1032794 <---
R	1366852-1367677	826	*orf19.725*			1366381-1367172 --->	*orf19.723*	*BCR1*		1370532-1368310 <---
R	1488942-1489356	415	*orf19.2370*	*DSL1*		1487334-1489376 --->	*orf19.2369.1*	*ATX1*		1489772-1489548 <---
R	2034950-2036327	1378	*orf19.6608/ tara-Ra (LTR)*		b/	2034660-2032492 <---/ 2035222-20355006 --->	*orf19.6607*			2036446-2035832 <---

Der Stamm HLCEEFG1 (HA-Efg1) und der Kontroll-Stamm DSC11 (Efg1) wurden unter Hyphen-Wachstumsbedingungen in YP-Medium mit 10 % Serum für 30 min bei 37 °C induziert. Protein-DNA-Interaktionen wurden durch die Zugabe von Formaldehyd fixiert und alle folgenden Schritte wie in der Anhang-Tabelle 9.1 beschrieben durchgeführt. Aufgelistet sind HA-Efg1 gebundene signifikante (FDR ≤ 0,05) chromosomale Regionen mit den zur Binderegion nächstpositionierten 5´- und 3´-ORFs. Türkise Schrift kennzeichnet eine Efg1-Bindung innerhalb der entsprechenden kodierenden Regionen. Gelbe Unterlegungen verdeutlichen das mehrfache Auftreten gleicher Stromauf- bzw. Stromabwärts-ORFs. Eine Markierung durch Sternchen * zeigt an, dass die Binderegionen von 2 (anstatt von 3) unabhängigen ChIP-chip-Replikaten abgeleitet wurden. In Transkriptomstudien ermittelte Efg1-regulierte Gene sind durch **a.** Doedt *et al.* (2004) und durch **b.** Setiadi *et al.* (2006) gekennzeichnet.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die motivierende Betreuung während der gesamten Doktorarbeit, sowie für die Unterstützung und den Einsatz vor allem in der Schlußphase, wodurch mir eine rechtzeitige Abgabe meiner Arbeit ermöglicht wurde, ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Bott danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats sowie für die sehr schnelle Begutachtung meiner Arbeit.

Vielen lieben Dank an das gesamte Institut! Es war eine echt schöne Zeit auf den beiden Laborgängen :-) Danke für die tolle Arbeitsatmosphäre, eure Hilfsbereitschaft, die fachlichen und weniger fachlichen Unterhaltungen, die Aufmunterungen, wenn´s mal nicht so doll lief, die Kirmes- und Altstadtbesuche, das gemeinschaftliche Grillen, das Fußball-WM gucken, die Mädelsabende, meinen Junggesellinnenabschied (Danke Mädels und ein Extra-Danke an dich Eva!), die Stuhlwettrennen, Karneval mit euch und und und… (ohne dich Isi wär Altweiber nur halb so schön und die Laborarbeit nur halb so lustig gewesen! Halt durch, ist nicht mehr lang!)
Danke ihr Lieben!

Unserer Anna möchte ich für ihren enormen Einsatz für uns alle danken! Danke für die vielen sterilen Kolben und Reagenzgläser in den Schränken, derer ich mich so oft und so zahlreich bedient habe ;-)

Liebe Lu, danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und immer für mich da bist! Welch ein Glück, dass wir damals vor fast 19 Jahren in eine Klasse gekommen sind…

Ein ganz großes, dickes **DANKE** gilt meinem Freund und Mann Ingo, der immer für mich da ist und mich bei allem unterstützt und jegliches Freud und Leid während der Doktorjahre miterlebt hat. Vielen lieben Dank auch für das abendliche Korrekturlesen und das Beheben der vielen (versteckten) Leerzeichen. Endlich können wir wieder zusammen die Berge hochradeln!

Erklärung

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Lassak, T., Schneider, E., Bussmann, M., Kurtz, D., Manak, J.R., Srikantha, T., Soll, D.R., and Ernst, J.F. (2011) Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator.
Mol Microbiol **82**: 602-618.

Düsseldorf, 08.11.2011

(Theresia Lassak)