

**Transkriptionelle Steuerung von Morphogenese und Metabolismus  
des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*  
durch die APSES-Proteine Efg1p und Efh1p**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
Thomas Doedt  
aus Düsseldorf

Düsseldorf  
2003

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Korreferentin: Prof. Dr. E. Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2004

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der humanpathogene Pilz <i>Candida albicans</i> – klinische Bedeutung und Therapie .....	1
1.2	<i>C. albicans</i> -Taxonomie und Genetik .....	2
1.3	<i>C. albicans</i> -Virulenzfaktoren .....	4
1.3.1	Adhäsion an Wirtszellen .....	4
1.3.2	Sekretion von Proteinen .....	5
1.3.3	Dimorphismus .....	5
1.3.4	Sonstige Virulenzfaktoren .....	7
1.4	Regulation des Dimorphismus .....	8
1.5	Die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Efh1p .....	10
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit .....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	Chemikalien und Enzyme .....	15
2.2	Stämme und Medien .....	15
2.2.1	Bakterien-Stämme .....	15
2.2.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	15
2.2.3	Hefe-Stämme .....	16
2.2.4	Medien und Anzucht von Hefen .....	17
2.2.5	Hypheninduktion bei <i>C. albicans</i> in flüssigen Medien .....	18
2.2.6	Hypheninduktion bei <i>C. albicans</i> auf festen Medien .....	18
2.3	Plasmide und Primer .....	18
2.3.1	Basisplasmide .....	18
2.3.2	Konstruierte Plasmide .....	20
2.3.3	Synthetische Oligonukleotide .....	21
2.4	Präparation von Nukleinsäuren .....	22
2.4.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	22
2.5	Molekularbiologische Methoden .....	22
2.5.1	Restriktionsendonukleolyse .....	22
2.5.2	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden .....	23
2.5.3	Phosphatasereaktion .....	23
2.5.4	Ligation .....	23
2.5.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese .....	23
2.5.6	Größenstandard für DNA .....	23
2.5.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	24
2.5.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	24
2.5.9	PCR (Polymerase-Kettenreaktion) .....	24
2.5.9.1	Multiplex-PCR .....	24
2.5.9.2	Kolonie-PCR .....	25
2.5.9.3	Mutagenese-PCR .....	25
2.6	Biochemische Methoden .....	25
2.6.1	DNA-Microarrays .....	25
2.6.1.1	Anzucht der Zellen .....	25
2.6.1.2	Präparation von RNA aus <i>C. albicans</i> .....	26
2.6.1.3	Synthese der Komplementär-DNA .....	26
2.6.1.4	Hybridisierung und Waschen der DNA-Microarrays .....	27
2.6.1.5	Scannen der DNA-Microarrays .....	27
2.6.1.6	Normalisierung und statistische Auswertung .....	28

2.6.1.7	Clusteranalysen .....	28
2.7	Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse .....	28
2.7.1	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) .....	29
2.7.2	Analyse von Proteinen .....	30
2.7.2.1	Herstellung von Hefe-Rohextrakten .....	30
2.7.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	30
2.7.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.7.2.4	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine über Western Blot-Analyse... .....	31
2.7.2.5	Immunpräzipitation .....	32
2.7.3	Koimmunpräzipitation .....	32
2.7.3.1	Zwei-Hybrid-Analyse .....	33
2.7.3.2	Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität („Overlay-Assay“) .....	33
2.7.3.3	Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	33
2.7.3.4	Bestimmung der Luziferase Aktivität .....	34
2.8	Transformation .....	34
2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
2.8.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	34
2.8.3	Transformation von <i>C. albicans</i> .....	35
2.9	Calcofluor White-Färbung .....	35
2.10	Konstruktion einer <i>EFG1-GFP</i> -Fusion .....	35
2.11	Mikroskopische Untersuchungen .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Überexpression von <i>EFG1</i> und <i>EFH1</i> .....	36
3.2	Einfluss der Deletion und Überexpression von <i>EFH1</i> auf die Hyphenbildung .....	37
3.3	Lokalisation von Efg1p .....	39
3.4	Nachweis von Efh1p und Efg1p im Immunoblot .....	40
3.5	Autoregulation von <i>EFG1</i> .....	41
3.5.1	DNA-Bindung von Efg1p .....	41
3.5.2	DNA-Bindung von Sin3p .....	42
3.6	Interaktionsanalyse von Efg1p und Sin3p .....	44
3.6.1	Koimmunpräzipitation von Efg1p und Sin3p .....	44
3.6.2	Zwei-Hybrid Analyse von Efg1p und Sin3p .....	45
3.7	Regulation des <i>EFH1</i> - und <i>EFG1</i> -Promotors .....	47
3.7.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes und Analyse des Promotors von <i>EFH1</i> .....	47
3.7.2	<i>EFH1</i> - und <i>EFG1</i> -Promotoraktivität in verschiedenen Stämmen .....	49
3.8	Genomweite Transkriptomanalyse .....	50
3.8.1	Transkriptomanalyse der <i>efg1</i> und <i>efh1</i> Einzelmutante sowie der <i>efg1-efh1</i> - Doppelmutante .....	52
3.8.1.1	Einfluss von Efg1p auf das Transkriptom .....	54
3.8.1.2	Hyphenspezifische Efg1p regulierte Gene .....	57
3.8.1.3	Einfluss von Efh1p auf das Transkriptom .....	58
3.8.2	Transkriptomanalyse von <i>EFG1</i> und <i>EFH1</i> -Überexpressionsstämmen .....	58
3.9	Northernblot-Analyse der <i>FBA1</i> , <i>PFK1</i> , <i>FUM12</i> und <i>HHT21</i> -Expression .....	62
3.10	Antimycin A – Sensitivität der <i>efg1</i> -Mutante .....	62
3.11	Bindung von Efg1p an MCB-Elemente .....	64
3.12	Einfluss einer <i>EFG1</i> -Fusion an die Gal4p-Aktivierungsdomäne .....	66

3.13	Regulation des <i>FLO1</i> ( <i>IPF5185</i> ) –Promotors .....	67
3.14	Regulation des <i>SAP2</i> -Promotors .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
4.1	Überexpression von <i>EFG1</i> und <i>EFH1</i> induziert pseudohyphales Wachstum und reprimiert echte Hyphenbildung.....	73
4.2	Regulation des <i>EFG1</i> -und <i>EFH1</i> -Promotors .....	74
4.3	<i>EFG1</i> ist autoreguliert und ein direktes Zielgen des eigenen Genprodukts.....	75
4.4	Efg1p ist ein Regulator des Kohlenstoffmetabolismus .....	78
4.5	Efg1p reguliert die Expression von Virulenzfaktoren.....	81
4.6	Einfluss der <i>efh1</i> -Deletion sowie einer <i>EFH1</i> - und <i>EFG1</i> -Überexpression auf das Transkriptom von <i>C. albicans</i> .....	82
4.7	Efg1p bindet <i>in vivo</i> an ein MCB-Element .....	83
4.8	Die Gene <i>FLO1</i> und <i>SAP2</i> werden durch Efg1p reguliert.....	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>106</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* – klinische Bedeutung und Therapie

Pilze haben im Leben des Menschen schon seit langer Zeit eine große wirtschaftliche und medizinische Bedeutung. Schon im Altertum wurde der Ascomycet *Saccharomyces cerevisiae* zur Herstellung von Brot und Bier genutzt. Heutzutage reicht das Spektrum von Produkten, die mit Hilfe von *S. cerevisiae* oder andere Pilzen hergestellt werden, von Lebensmitteln wie Brot, Käse, Bier und Wein bis hin zu biotechnologischen Produkten, einschließlich Antibiotika und Impfstoffen. Darüber hinaus dient *S. cerevisiae* wegen seiner leichten Kultivier- und Manipulierbarkeit als eukaryotischer Modellorganismus für die moderne Molekulargenetik.

Neben diesen „nützlichen“ Pilzen gibt es auch eine Reihe von Pilzen, die das Leben des Menschen direkt oder indirekt negativ beeinflussen. Der Befall von Roggen durch *Claviceps purpurea* (Auslöser des Mutterbrand) oder von Mais durch *Ustilago maydis* (Auslöser des Beulenbrand) verursacht jährlich Ernteeinbußen und damit große wirtschaftliche Verluste. Aber auch der Mensch selber wird von rund 300 pathogenen Pilzarten als Wirt genutzt. Dabei verursachen weniger als ein Dutzend der Pathogene weit über 90 % aller Infektionen (Edmond *et al.*, 1999). Zu den bedeutendsten humanpathogenen Pilzen gehören *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus*. In Deutschland werden 80 % aller Mykosen durch *Candida*-Spezies ausgelöst (Pfaller, 1996). Sie gelten als die vierthäufigsten Sepsiserreger und werden damit genauso oft isoliert wie gramnegative Bakterien. Hierbei hat sich die Inzidenz innerhalb eines Zeitraums von 10 Jahren verdoppelt (Beck-Sagué und Jarvis, 1993; Edmond *et al.*, 1999; Abi-Said *et al.*, 1997). Obwohl Spezies wie *C. glabrata* und *C. krusei* in den letzten Jahren an klinischer Bedeutung hinzugewonnen haben, ist *C. albicans* mit etwa 50 % der immer noch am häufigsten isolierte *Candida*-Erreger (Viscoli *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 1999). Als Grund für die steigende Inzidenz der „Nicht-Albicans“-Arten wird die Selektion von weniger empfindlichen Spezies unter dem Druck von Antimykotika wie Fluconazol diskutiert (Marr *et al.*, 2000).

*C. albicans* ist ein Kommensale des Gastrointestinaltraktes, der sich bei rund 30 % aller Menschen sowohl auf den Mundschleimhäuten als auch im Darm befindet (Vermeersch *et al.*, 1989; McCulloch *et al.*, 1996). Zu einer Erkrankung kommt es erst dann, wenn bestimmte Bedingungen die lokale oder systemische Ausbreitung des Pilzes fördern. So entstehen bevorzugt auf feuchten und warmen Hautflächen, oberflächliche Mykosen, wie die Windel-dermatitis. Etwa drei Viertel aller Frauen haben mindestens einmal in ihrem Leben eine vaginale Candidose, 20 % der Frauen sogar mehrfach (Fidel *et al.*, 1999; Sobel, 1997).

Während diese oberflächlichen Mykosen relativ leicht therapierbar sind, verlaufen systemische Infektionen in mehr als 50 % der Fälle tödlich (Wey *et al.*, 1988). In Deutschland sind jährlich rund 8.000-10.000 Todesfälle auf *Candida*-Infektionen zurückzuführen (Morschhäuser *et al.*, 1997). Systemische Candidosen werden in der Regel durch eine gestörte Immunabwehr initiiert. Die Schwächen des Immunsystems werden durch Krankheiten, aber insbesondere auch durch den Einsatz von Chemotherapeutika und Immunsuppressiva ausgelöst. Zu den Hauptrisikofaktoren einer *Candida*-Infektion gehören Malignome, bauchchirurgische Eingriffe, Diabetes

mellitus sowie HIV-Infektionen (Kao *et al.*, 1990). So kann bei rund 90 % aller mit dem HIV-Virus infizierten Patienten eine orale und im weiteren Krankheitsverlauf auch oft systemische Candidose diagnostiziert werden (Greenspan, 1996).

Aufgrund dieser enormen klinischen Bedeutung ist es nötig, neue Angriffspunkte für Antimykotika zu finden. Da sowohl *C. albicans* als auch der Mensch zur Gruppe der Eukaryonten gehören und somit Zellaufbau und zelluläre Abläufe einander sehr ähnlich sind, besteht die Problematik zunächst darin, pilzspezifische essentielle Zielreaktionen zu finden. Unter den wenigen heute bekannten Antimykotika werden die Polyene, unter ihnen Amphotericin B und Nystatin, am häufigsten eingesetzt. Durch Bindung und Oligomerisierung der pilzspezifischen Membrankomponente Ergosterol wird die Membran der Pilze permeabilisiert, was letztendlich zum Zelltod führt (Groll *et al.*, 1998). Azole (z.B. Clotrimazol, Miconazol und Fluconazol), welche aufgrund ihrer fungistatischen Wirkung meist nur bei lokalen Infektionen angewandt werden, inhibieren hingegen die Synthese des Ergosterol. Hierbei wird das zu den Cytochromen P450 gehörende Enzym Erg11p, welches durch Demethylierung von Lanosterol Ergosterol bildet, inhibiert. Viele der heute bekannten Antimykotika, insbesondere die Azole, sind mit starken Nebenwirkungen wie Leber- und Nierenschäden verbunden (Coukell und Brogden, 1998). Eine relativ neue und für den Menschen sehr gut verträgliche Gruppe von Antimykotika ist die Gruppe der Candine (Echinocandine und Pneumocandine). Das bekannteste unter ihnen ist Caspofungin, welches ein Fermentationsprodukt des Pilzes *Glarea lozoyensis* ist. Es inhibiert die Synthese des  $\beta(1,3)$ -Glukans, einem Hauptbestandteil der pilzlichen Zellwand, und führt somit zu einer osmotischen Instabilität der Zelle.

Die vermehrte Anwendung von Antimykotika in der Medizin, aber auch in der Landwirtschaft, hat zur Folge, dass resistente Stämme selektioniert werden. Resistenzen bei Pilzen entstehen einerseits durch eine Hemmung der Zugänglichkeit zum Wirkungsort, indem durch eine veränderte Zellwand oder durch verstärkten Export die Interaktion mit dem Zielenzym inhibiert wird. Andererseits kann das „Target“ selbst betroffen sein. So wird z. B. durch Mutation die Affinität zum Antimykotikum verhindert oder durch Überproduktion (z. B. durch Chromosomenverdoppelung) die Inhibierung kompensiert. Einige Mechanismen bakterieller Resistenzen, wie die Degradation der Wirksubstanz (z.B. Penicillin), haben bei Pilzen keine Bedeutung (Ghannoum *et al.*, 1999; White *et al.*, 1998).

## 1.2 *C. albicans* -Taxonomie und Genetik

Die klassische Einteilung der echten Pilze (Eumyzetten) erfolgt anhand morphologischer Kriterien ihrer geschlechtlichen (teleomorphen) Form. Die wichtigsten Grundformen hierbei sind das Basidium, bei dem sich die Sporen nach außen hin abschnüren, und der Ascus, bei dem die Sporen im Inneren heranreifen. Die bekanntesten Vertreter der Ascomyceten sind *S. cerevisiae* und *Aspergillus nidulans*. Diese Pilze liegen jedoch die meiste Zeit in ihrer ungeschlechtlichen (anamorphen) Form vor. *C. albicans* wird bislang zur Gruppe der Deuteromyceten zugeordnet. In dieser Gruppe sind die Pilze zu finden, bei denen kein sexueller Vermehrungszyklus nachgewiesen wurde, und somit keine Einteilung nach der Morphologie ihrer teleomorphen Form möglich ist. Die Ergebnisse moderner molekulargenetischer Untersuchungen, wie Sequenzvergleiche der ribosomalen RNA (16S rRNA), weiterer Gene und Proteine, zeigen, dass *C. albicans* eine große Verwandtschaft zur Gruppe der Ascomyceten, insbesondere zu *S. cerevisiae*, aufweist (Peterson, 2000). Da die komplette Genomsequenz von *C. albicans*

mittlerweile sequenziert und publiziert ist (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>), konnten in *C. albicans* *MTL*-Gene („mating type like“) identifiziert werden, welche eine hohe Homologie zu dem *MAT*-Paarungstyp-Locus von *S. cerevisiae* aufweisen (Hull und Johnson, 1999). Der *MAT*-Locus determiniert den Paarungstyp und steuert die sexuelle Vermehrung von Hefezellen. *C. albicans*-Stämme, die durch genetische Manipulation homozygot für den *MTL*-Locus sind, können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* fusionieren (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000; Lachke *et al.*, 2003). Durch Chromosomenverlust können diese tetraploiden Stämme wieder in den diploiden Zustand übergehen (Bennett und Johnson, 2003). Auch die Anwesenheit und Funktion eines Pheromons deutet darauf hin, dass *C. albicans* einen potentiellen sexuellen Vermehrungszyklus besitzt (Bennett, *et al.*, 2003; Lockhart *et al.*, 2003). Bis jetzt konnte allerdings die für eine geregelte sexuelle Vermehrung nötige Meiose nicht nachgewiesen werden, da alle Paarungsprodukte tetraploid waren.

Die Tatsache, dass das Genom von *C. albicans* in diploider Form vorliegt, erschwert genetische Untersuchungen. Um Aussagen über die Funktion eines Gens zu machen, müssen beide Allele eines Gens disruptiert werden, da die Deletion nur eines Allels meistens keinen Phänotyp zeigt. Einige Methoden der Gendisruption wurden in den letzten Jahren entwickelt. So stehen neben der „URA-Blaster“-Methode (Fonzi und Irwin, 1993), zwei weitere Methoden zur Verfügung. Diese nutzen einerseits einen verkürzten homologen Bereiche zur Integration, und andererseits die induzierte Expression einer Rekombinase, welche die intrachromosomale Rekombination ermöglicht (Wilson *et al.*, 1999; Morschhäuser *et al.*, 1999). Zur Selektion von Transformanten nach Gendisruptionen, aber auch zur Transformation von Plasmiden werden die Marker *URA3* und *ADE2* zur Komplementation entsprechender auxotropher Mutanten genutzt (Kelly *et al.*, 1987; Kurtz *et al.*, 1987). Ein besonderes Problem stellt der veränderte Kodon-Gebrauch bei *C. albicans* dar. Während das CUG in anderen Pilzen bei der Proteinbiosynthese in Leucin translatiert wird, übersetzt *C. albicans* dieses Basentriplett in die Aminosäure Serin (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995). Hierdurch wird insbesondere die Expression heterologer Reportergene erschwert. Mittlerweile stehen jedoch mit dem Luziferase-Gen *RLUC* aus der Seegurke *Renilla reniformis*, dem *lacZ*-Gen aus *Streptococcus thermophilus* und dem *GFP*-Gen aus *Aequorea victoria*, eine Reihe von Reportergenen zur Verfügung (Srikantha *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, 1997; Uhl und Johnson, 2001). Diese sind entweder wie im Falle des *GFP* dem veränderten Kodongebrauch angepasst, oder sie besitzen überhaupt kein CUG-Kodon.

Neben dem Gebrauch von Reportergenen ist der Einsatz von regulierbaren Promotoren für genetische Untersuchungen unerlässlich. Der *PCK1*-Promotor, welcher bei Anwesenheit von Glukose reprimiert und bei nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen stark induziert ist, eignet sich insbesondere zur Überexpression eines Gens (Leuker *et al.*, 1997). Zur Untersuchung essentieller Gene eignet sich besonders der Promotor des *MET3*-Gens, da er eine sehr niedrige basale Aktivität hat. Die Expression eines essentiellen Gens unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors kann durch Zugabe von Methionin und Cystein soweit reduziert werden, dass die Zellen nicht mehr wachsen (Care *et al.*, 1999). Der von Nakayama (2000) beschriebene *tet*-Promotor ist besonders dazu geeignet, die Expression eines Gens auch im Tiermodell zu regulieren. So kann durch Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin die Expression eines unter Kontrolle des *tet*-Promotors stehenden Gens inhibiert werden.

Trotz der eingeschränkten Möglichkeiten und der beschriebenen Problematik hat die molekulargenetische Forschung an *C. albicans*, insbesondere durch den Abschluss des Genom-

Sequenzierungsprojekts, in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Hierdurch wurde es möglich modernste molekulargenetische Methoden, wie die DNA-Microarray-Technologie für die Genanalysen zu nutzen. Die Annotierung der Genomsequenz durch ein europäisches Konsortium erleichtert diese Analysen (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>). Hierbei wurde jedes offene Leseraster per Computeranalyse annotiert und Homologien, insbesondere zu den nahverwandten *S. cerevisiae*-Genen aufgezeigt.

### 1.3 *C. albicans* -Virulenzfaktoren

Bei der Besiedelung und Infektion eines Wirtes herrscht ein steter Kampf zwischen dem Immunsystem des Wirtes und den Virulenzfaktoren des Pilzes. Das Zusammenspiel mehrerer Virulenzfaktoren zeichnet die Pathogenität von *C. albicans* aus. Im Folgenden werden die Virulenzfaktoren von *C. albicans* zusammengefasst.

#### 1.3.1 Adhäsion an Wirtszellen

Voraussetzung für eine Kolonisation und Infektion des Wirtes und die anschließende transepitheliale Migration ist zunächst die Adhäsion an die Wirtsepithelien (Zink *et al.*, 1996; Weide und Ernst, 1999). Die im Vergleich zu apathogenen Pilzen hohe Hydrophobizität der Oberfläche von *C. albicans* unterstützt die Adhäsion an die Wirtsoberfläche (Mc Cullough, 1996). Neben diesen unspezifischen Oberflächeneigenschaften, welche die Adhäsion begünstigen, existieren so genannte Adhäsine. Dies sind Pilzproteine, die spezifisch an Oberflächenkomponenten der Wirtsepithelien binden. Hierzu gehören z. B. Integrin-ähnliche Proteine, die an eine so genannte RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenz der Matrixproteine Fibronectin, Laminin, Fibrinogen oder Kollagen binden (Casanova *et al.*, 1992; Bouchara *et al.*, 1990; Skerl *et al.*, 1984). Andere Adhäsine binden an Zuckerreste, wie Fukose, N-Acetylglukosamin oder die Blutgruppenantigene, die auf der Wirtsoberfläche zu finden sind (Brassart *et al.*, 1991; Cameron und Douglas, 1996). Die meisten der bisher identifizierten Adhäsine gehören zur Gruppe der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-abhängigen Zellwandproteine (Sundstrom, 2002). Diese Proteine, unter ihnen Hwp1p, Als1p und Als5p, sind am C-terminalen Ende über den Rest eines GPI-Ankers an das Glukangerüst der Zellwand gebunden (Staab *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 1999; Hoyer, 2001). Die Bindung an die Bestandteile der Wirtsoberfläche wird über das N-terminale Ende der Proteine vermittelt. Prinzipiell lässt sich sagen, dass die Adhäsion auf eine Wechselwirkung zwischen glykosylierten Oberflächenproteinen von *C. albicans* und Oberflächenmerkmalen der Wirtszelle zurückzuführen ist. Die Bedeutung der Glykosylierung der Adhäsine wird vor allem dadurch deutlich, dass Glykosylierungsmutanten wie *pmt1* oder *mnt1*-Deletionsstämme, eine verminderte Adhäsion und Virulenz zeigen (Timpel *et al.*, 1998; Buurman *et al.*, 1998; Ernst und Prill, 2001).

Neben der Adhäsion an Wirtszellen, ist *C. albicans* ebenfalls in der Lage, an künstlichen, glatten Oberflächen wie Glas oder Plastik zu adhären (Kumamoto, 2002). Diese Eigenschaft, die im Zusammenhang mit der Bildung so genannter Biofilme steht, ist insbesondere in der modernen Medizin problematisch. Die Biofilme bestehen aus Hefe- und Hyphenzellen, welche in eine exopolymerische Matrix eingebettet sind und werden oftmals auf implantierten Kathetern

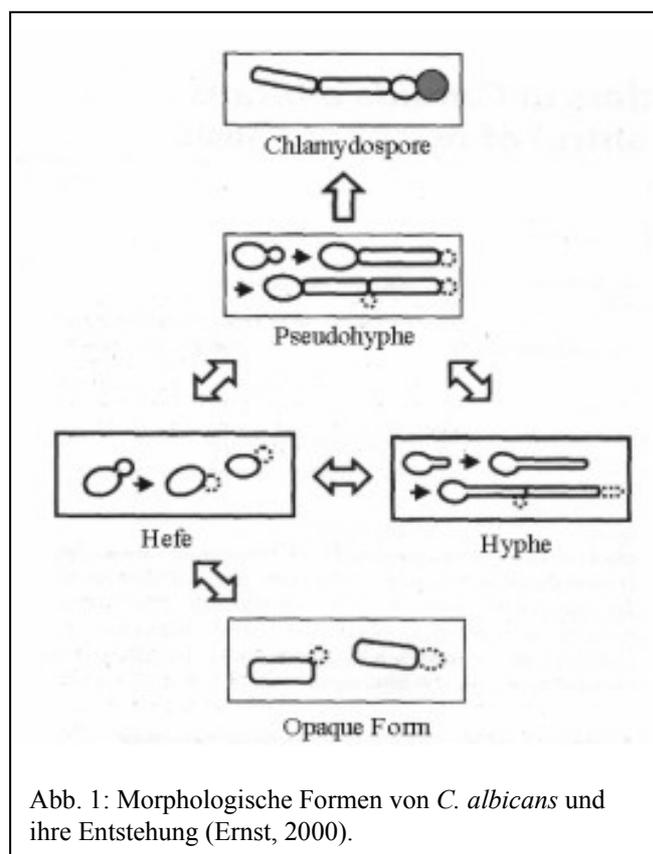
gebildet (Douglas, 2003). Vor allem die hohe Resistenz der Biofilme gegen die meisten heute verwendeten Antimykotika stellt ein großes medizinisches Problem dar (Ramage *et al.*, 2001).

### 1.3.2 Sekretion von Proteinen

Ein weiterer Virulenzfaktor von *C. albicans* ist die Sekretion von Proteinen, deren Bedeutung neben der Bereitstellung neuer Nährstoffquellen möglicherweise in der Proteolyse von Wirtszellen liegt. Zu diesen Proteinen und Peptiden gehören Siderophore, Phospholipasen, N-Acetylglucosaminidasen und Proteasen (Naglik *et al.*, 2003; Ghannoum *et al.*, 2000; Niewerth und Korting, 2001; Molloy *et al.*, 1994; Sweet und Douglas, 1991). Die am besten untersuchten sekretierten Proteine gehören zu der *SAP*-Genfamilie, deren zehn Mitglieder *SAP1-SAP10* für saure Aspartatproteasen kodieren (Naglik *et al.*, 2003a). Die Sap-Proteine, welche untereinander eine sehr große Homologie zeigen, werden während der Invasion gewebespezifisch und zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert und sekretiert (Felk *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2000). So werden die Proteine Sap1p, Sap3p und Sap8p vornehmlich bei vaginalen Infektionen und die Proteasen Sap4p und Sap7p hauptsächlich bei oralen Infekten sekretiert (Naglik *et al.*, 2003b). Einige *SAP*-Gene werden vermehrt bei oberflächlichen (*SAP1-3*), andere bei systemischen (*SAP4-6*) Mykosen exprimiert (Schaller *et al.*, 2001). Die Sap-Proteine zerstören hierbei durch proteolytischen Abbau die Oberflächenproteine der Wirtszelle und erleichtern somit vermutlich die Invasion von *C. albicans* (Schaller *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 2003). Gleichzeitig werden durch den proteolytischen Abbau der Wirtsproteine neue Aminosäuren für die Vermehrung des Pilzes bereitgestellt. Stämme, bei denen einzelne oder mehrere *SAP*-Gene deletiert wurden, zeigen eine reduzierte Virulenz (Korting *et al.*, 2003; Hube *et al.*, 1997).

### 1.3.3 Dimorphismus

Der Dimorphismus gilt als der wichtigste Virulenzfaktor von *C. albicans*. Er bezeichnet die Fähigkeit des Pilzes, einerseits als kugelige Blastospore und andererseits als filamentöse Hyphe zu wachsen (Odds, 1988). Die kugelige Blastospore entsteht durch Abknospung einer Tochterzelle von der Mutterzelle. Diese trennt sich, nachdem sie eine gewisse Größe erreicht hat von der Mutterzelle und kann dann ihrerseits knospen. Bei den filamentösen Zellen unterscheidet man zwischen so genannten Pseudohyphen und echten Hyphen (siehe Abb. 1). Während die Unterschiede dieser beiden Zelltypen mikroskopisch oft nur schwer zu erkennen sind, differieren sie jedoch deutlich in ihrer Entstehung. Pseudohyphen entstehen durch eine unipolare Knospung, wobei sich Mutterzelle und Tochterzelle nicht voneinander trennen. Durch Elongation der einzelnen Zellen entstehen hierbei oftmals lange Zellketten. Echte Hyphen hingegen entstehen durch Bildung eines apikal wachsenden Keimschlauches, der im späteren Verlauf sekundär septiert wird. Hinter den eingezogenen Septen können dann wieder neue Hefezellen knospen (Odds, 1988; Ernst 2000). Obwohl *C. albicans* als dimorpher Pilz bezeichnet wird, wäre die Bezeichnung polymorph treffender. So existiert neben der Hefeform und den beiden filamentösen Formen eine weitere charakteristische Wachstumsform, die Chlamydosporen. Es wird diskutiert, dass diese dickwandigen Zellen, welche meist terminal aus pseudohyphalen Suspensorzellen entstehen, eine Überdauerungsform darstellen (Joshi *et al.*, 1993; Montazeri und Hedrick, 1984).



Unter normalen Laborbedingungen (Vollmedium und 30°C) wächst *C. albicans* als Hefezelle, in klinischen Isolaten jedoch lassen sich sowohl die Hefeform als auch filamentöse Zellen beobachten. Durch Veränderung der Wachstumsbedingungen wie Mediumzusammensetzung, Temperatur oder Sauerstoffgehalt kann auch *in vitro* die Bildung von filamentösen Zellen ausgelöst werden. Viele dieser Bedingungen erinnern an Bedingungen, welche im menschlichen Körper zu finden sind. So reicht z. B. eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C um das hyphale Wachstum zu induzieren. Aber auch ein neutraler pH-Wert, sowie die Zugabe von Serum, N-Acetylglukosamin oder Prolin induzieren die Filamentbildung (Buffo *et al.*, 1984; Cassone *et al.*, 1985; Land *et al.*, 1975). Bei der nahe verwandten, aber apathogenen Hefe *S. cerevisiae*, die ebenfalls in der Lage ist als Pseudohyphe zu wachsen, haben diese Stimuli keinen Effekt.

Allerdings induzieren umgekehrt die Stickstoffmangelbedingungen, die bei *S. cerevisiae* das pseudohyphale Wachstum auslösen, hyphales Wachstum bei *C. albicans* (Csank *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994). Die Fähigkeit zum Wechsel zwischen Hefe und filamentöser Form verschafft *C. albicans* entscheidende Vorteile bei der Kolonialisierung und Verbreitung im Wirt. Die Blastospore spielt besonders im frühen Prozess der Infektion eine Rolle (Saville *et al.*, 2003). Durch Knospung ist sie in der Lage sich schnell zu vermehren und kann so rasch mit dem Blutstrom im Körper verteilt werden (Cutler, 1991). Die filamentöse Hyphenform hingegen ist aufgrund ihrer hydrophoben Oberfläche besonders geeignet an Epithelien zu adhären (Odds, 1994; Hostetter, 1994). Aber auch die Penetration von Zellen erfolgt durch Hyphenzellen. So ist *C. albicans* in der Lage nach Phagozytose durch Makrophagen diese zu penetrieren und aus diesen herauszuwachsen (Vasquez-Torres und Balish, 1997). Die Hyphenzellen von *C. albicans* zeigen beim Wachstum einen so genannten Thigmotropismus (Watts *et al.*, 1998; Sherwood *et al.*, 1992). Sie reagieren dabei auf mechanische Reize, wie dem Kontakt zur Wirtszelle, und können daraufhin ihre Wachstumsrichtung ändern. Die Bedeutung des Thigmotropismus liegt vermutlich in einer erleichterten Penetration der Gewebe, da die Hyphenzellen dadurch in der Lage sind, entlang epithelialer Zelfurchen zu wachsen und so erleichtert die Gewebe penetrieren können (Gow, 1997).

Die Fähigkeit zum filamentösen oder dimorphen Wachstum ist keine zwingende Voraussetzung für die Pathogenität von Pilzen. So existieren sowohl dimorphe Pilze wie *S. cerevisiae*, die nicht pathogen sind, aber auch pathogene Pilze wie *C. glabrata*, die nicht als Hyphen wachsen können. Für die Virulenz von *C. albicans* ist der Dimorphismus aber von entscheidender Bedeutung. Dies wird dadurch deutlich, dass Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind filamentös zu wachsen, im Tiermodell avirulent sind (Lo *et al.*, 1997). Auch ein Stamm, bei dem die Fähigkeit zur Hyphenbildung *in vivo* extern moduliert werden kann, ist nur bei Bedingungen,

die das filamentöse Wachstum erlauben, virulent (Saville *et al.*, 2003). Die Regulation des Dimorphismus, die ein zentrales Thema dieser Arbeit ist, wird im Kapitel 1.4 beschrieben.

#### 1.3.4 Sonstige Virulenzfaktoren

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass von Makrophagen phagozytierte *C. albicans* Zellen, die für Enzyme des Glyoxylatzyklus kodierenden Gene verstärkt exprimieren (Prigneau *et al.*, 2003). Fehlen den Zellen die entscheidenden Enzyme des Glyoxylatzyklus, die Isocitratlyase und Malatsynthase, sind die Stämme deutlich weniger virulent (Lorenz und Fink, 2001). Auch bei dem humanpathogenen Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* wird die Isocitratlyase nach der Phagozytose durch Makrophagen verstärkt exprimiert (Graham und Clark-Curtiss, 1999). Obwohl über die Rolle des Glyoxylatzyklus als Virulenzfaktor diskutiert wird, bleibt die Frage offen, ob es sich hierbei nicht eher um einen Fitnessfaktor handelt (Lorenz und Fink, 2002). So werden bei Phagozytose durch Neutrophile sowohl bei *C. albicans* als auch bei *S. cerevisiae* Aminosäurebiosynthesegene hochreguliert, obwohl beide Hefen aus diesen Immunzellen nicht herauswachsen können (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird auch in der apathogenen Hefe *S. cerevisiae* der Glyoxylatzyklus induziert (Lorenz und Fink, 2001).

Ein Protein, welchem eine Rolle als Virulenzfaktor zugesprochen wird, wird von dem *ENO1*-Gen kodiert. Dieses besonders stark transkribierte Gen kodiert für eine 2-Phospho-D-Glycerat-Hydrolase, einem Enzym der Glykolyse (Mason *et al.*, 1993). Das Eno1-Protein ist nicht nur im Zytoplasma zu finden, sondern ist ebenfalls in großen Mengen an der Zelloberfläche lokalisiert, wo es fest mit dem Glukan der Zellwand assoziiert ist (Angiolella *et al.*, 2002; Eroles *et al.*, 1997). Hier wirkt es als eines der stärksten Antigene und es spielt vor allem bei Allergien gegen Pilze eine große Rolle (Pitarch *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Eno1p aus *C. albicans* an humanes Plasminogen bindet, und der Pilz dadurch verstärkt in das Gewebe einwandern kann (Jong *et al.*, 2003). Die Bindung von Plasminogen und darauf folgende Umwandlung zu Plasmin durch Oberflächenproteine ist ein verbreiteter Prozess bei vielen pathogenen Pilzen und Bakterien (Whiting *et al.*, 2002; Fox und Smulian, 2001). Das gebildete Plasmin ist in der Lage, extrazelluläre Matrixproteine zu spalten und dadurch die Invasion und Verbreitung des Pathogenen zu erleichtern.

Ein weiterer möglicher Virulenzfaktor, der ähnlich wie der Dimorphismus auf zwei verschiedenen Wachstumsformen beruht, ist das „Phenotypic-Switching“. Dieser Wechsel zwischen den zwei Wachstumsformen *white* und *opaque* wurde bereits 1987 durch Slutzky *et al.* beschrieben. Während die Zellen der *white*-Form morphologisch von Hefe-Zellen nicht zu unterscheiden sind, bilden Zellen der *opaque*-Form leicht elongierte stäbchenförmige Zellen, deren Oberfläche charakteristische Ausstülpungen, so genannte „pimples“ tragen (Anderson *et al.*, 1990). Neben diesen morphologischen Unterschieden der zwei Phasen unterscheiden sich die Zellen hinsichtlich der Adhäsion an Wirtszellen, der Fähigkeit zur Hyphenbildung, der Sensitivität gegen Antimykotika sowie auch ihrer Virulenz (Kennedy *et al.*, 1988; Soll *et al.*, 1993; Soll *et al.*, 1991). Transkriptomanalysen von Zellen der zwei Phasen zeigten die differenzielle Expression von vielen Genen, die für Zellwandproteine oder für sekretierte Proteine kodieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen der *white*-Phase die Gene der

Glykolyse stärker und die Gene des Citrat-Zyklus weniger stark exprimieren als Zellen der *opaque*-Phase (Hube *et al.*, 1994; Srikantha und Soll, 1993; Lan *et al.*, 2002).

Bis vor kurzem wurde der Phänotypwechsel nur in einigen wenigen klinischen Isolaten von *C. albicans* beobachtet. Mittlerweile konnte jedoch ein enger Zusammenhang zwischen dem Phänotypwechsel und dem Paarungs-Prozess (siehe 1.2) beschrieben werden (Miller und Johnson, 2002). So werden das Paarungsverhalten, aber auch der Phänotypwechsel von den Homeodomänproteinen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sowie dem  $\alpha$ -Domänprotein  $\alpha 1$  reguliert. Sowohl klinische Isolate, als auch im Labor künstlich konstruierte Stämme, die entweder homozygot für den MTL $\alpha$ - oder MTL $\alpha$ -Locus sind, sind in der Lage zwischen der *white*- und *opaque*-Phase zu wechseln (Miller und Johnson, 2002; Lockhart *et al.*, 2002). Hierbei zeigte sich, dass Zellen der *opaque*-Phase die paarungskompetente Form darstellen, während Zellen der *white*-Phase die robustere und virulentere Phase repräsentieren. Neben der Regulation durch die MTL-Homeodomänproteine wird der Phänotypwechsel ebenfalls durch die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Efh1p reguliert. Bei Überexpression beider Proteine in Zellen der *opaque*-Phase erfolgt eine Massenkonzersion zu dem *white*-Phänotyp (Sonneborn *et al.*, 1999b; Tebarth, 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass *EFG1* hauptsächlich in Zellen der *white*-Phase exprimiert wird, und für den kompletten Wechsel von der *opaque* zur *white*-Form benötigt wird (Srikantha *et al.*, 2000).

## 1.4 Regulation des Dimorphismus

Der Dimorphismus von *C. albicans* ist neben anderen Faktoren von entscheidender Bedeutung für die Virulenz des Pilzes (siehe 1.3). Die Auslöser des dimorphen Wachstums sind Bedingungen, wie sie im menschlichen Wirt zu finden sind (z. B. 37°C, Serum). Obwohl wenig darüber bekannt ist, wie diese Reize wahrgenommen werden, konnten Proteine identifiziert werden, die diese Reize verarbeiten und die Morphogenese beeinflussen. Die funktionellen Zusammenhänge dieser Proteine sind bis auf zwei Signalwege größtenteils ungeklärt. Eine Hilfe für die Aufklärung dieser beiden Signalwege war die große Homologie zu bekannten Signalwegen in *S. cerevisiae*, die dort die Bildung von Pseudohyphen regulieren. Einer dieser Signalwege wird als „mitogen activated proteinkinase“-Kaskade (MAPK-Kaskade) bezeichnet. Dieser Signalweg reguliert neben der Pseudohyphenbildung auch die Paarungsantwort bei der sexuellen Fortpflanzung in *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 1993; Madhani und Fink, 1997). Bei dieser Kaskade wird ein Signal durch sukzessive Phosphorylierungen der Proteinkinasen Ste20p, Ste11p, Ste7p und Kss1p weitergeleitet und verstärkt. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ste12p durch die Proteinkinase Kss1p führt dann zur Aktivierung der Zielgene. Bei der Pheromonantwort werden hierbei durch Dimerisierung mit Mcm1p so genannte PRE-Elemente in den Promotoren gebunden, während bei der Induktion der Pseudohyphen Ste12p zusammen mit Tec1p an die FRE-Elemente bindet (Madhani und Fink, 1997). Der zweite Signalweg, der die Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* induziert, wird über die Proteinkinase A (PKA) gesteuert. Die drei katalytischen Untereinheiten der PKA, Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p werden nach einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Inaktivierung der regulatorischen Untereinheit Bcy1p aktiviert (Robertson und Fink, 1998; Pan und Heitmann, 1999). Die PKA reguliert daraufhin die in die Pseudohyphenbildung involvierten Transkriptionsfaktoren Sok2p, Phd1p und Sfl1p (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995; Robertson und Fink, 1998).

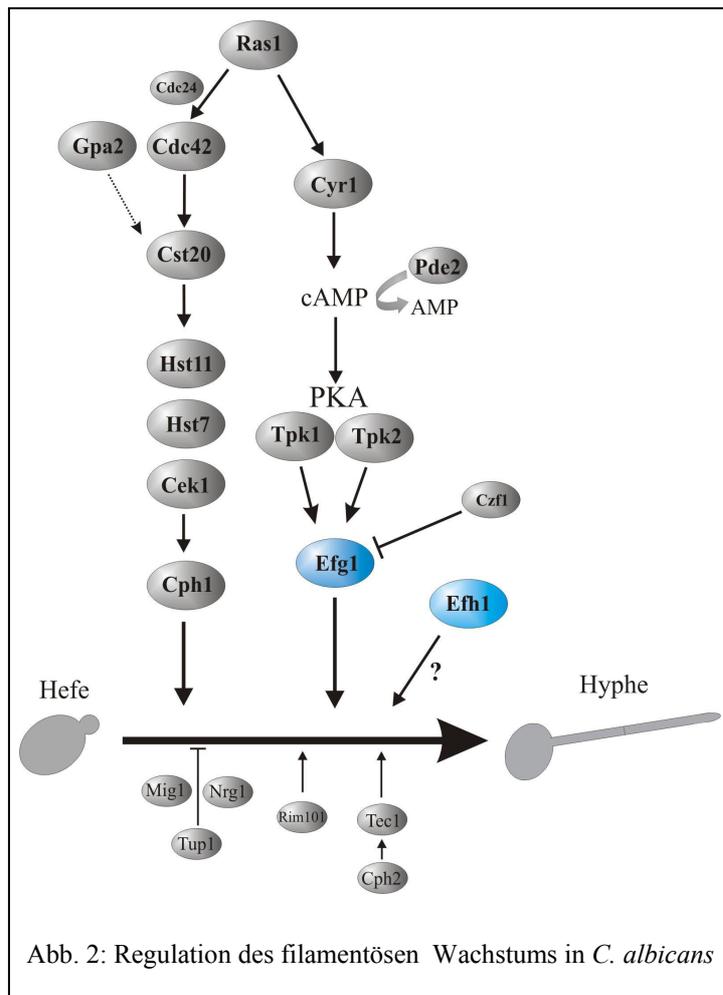


Abb. 2: Regulation des filamentösen Wachstums in *C. albicans*

Im Genom von *C. albicans* konnten Gene identifiziert werden, deren Genprodukte homolog zu den Proteinen der MAPK-Kaskade sowie des PKA-Wegs sind. Die homologen Proteine zu den Komponenten der MAPK-Kaskade werden von den Genen *CST20*, *HST11*, *HST7* sowie *CEK1* kodiert (Liu *et al.*, 1993; Csank *et al.*, 1998). Nach Phosphorylierung der MAP-Kinase Cek1p aktiviert diese den zu Ste12p homologen Transkriptionsfaktor Cph1p (Liu *et al.*, 1994; Csank *et al.*, 1998). Durch epistatische Untersuchungen konnte die Funktion und die Reihenfolge der Proteine in der Signaltransduktionskaskade bestätigt werden (Köhler und Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996). Wie auch in *S. cerevisiae* ist dieser Signalweg nicht nur an dem filamentösen Wachstum beteiligt, sondern er reguliert ebenfalls das Paarungsverhalten. So zeigen Mutanten von Genen der MAPK-Kaskade neben Defekten in der Filamentbildung und der Virulenz

auch eine verminderte Paarungseffizienz (Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002; Köhler und Fink, 1996). Die Defekte in der Filamentbildung sind nur unter bestimmten Induktionsbedingungen zu beobachten. Bei der Hypheninduktion durch Serum sind die Mutanten weiterhin in der Lage, Hyphen zu bilden (Liu *et al.*, 1994; Csank *et al.*, 1998). Die MAPK-Kaskade und der PKA-Weg werden analog zu *S. cerevisiae* über das G-Protein Ras1p aktiviert (Leberer *et al.*, 2001; Gimeno *et al.*, 1992). Die Signale werden dann einerseits über die GTPase Cdc42p, oder über die Adenylatzyklase Cdc35p auf die Signalwege weitergeleitet (Ushinsky *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* reguliert die G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit Gpa2p in *C. albicans* die MAPK-Kaskade, während in *S. cerevisiae* Gpa2p die Pseudohyphenbildung über Aktivierung des PKA-Wegs positiv beeinflusst wird (Sanchez-Martinez und Perez-Martin, 2002; Kubler *et al.*, 1997). Die Aktivität des PKA-Weges wird über den intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert. Moduliert wird dieser einerseits durch die Ras1p vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase und andererseits durch die Hydrolyse von cAMP durch die Phosphodiesterase Pde2p (Jung und Stateva, 2003; Rocha *et al.*, 2002). Ein hohe Konzentration von cyclischem AMP aktiviert die Proteinkinase A, die im Gegensatz zu *S. cerevisiae* nur aus zwei verschiedenen katalytischen Untereinheiten (Tpk1p und Tpk2p) besteht (Bockmühl *et al.*, 2001). Hierbei übernehmen die beiden Untereinheiten unterschiedliche Funktionen. So ist Tpk1p für die Hyphenbildung auf festen Medien und Tpk2p für filamentöses Wachstum in flüssigen Induktionsmedien verantwortlich (Bockmühl *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* ist die Proteinkinase A an der Regulation vieler Prozesse beteiligt. Neben dem pseudohyphalen Wachstum wird die

Antwort auf oxidativen, osmotischen und hitzebedingten Stress, der Reserve-Kohlenhydratstoffwechsel sowie die Eisenaufnahme reguliert (Charizanis *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2000). Auch für *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass Tpk1p und Tpk2p neben der Hyphenbildung an der Stressantwort beteiligt sind (Sonneborn, *et al.*, 2000; Bockmühl *et al.*, 2001). Der Transkriptionsfaktor Efg1p wird als ein zentraler Regulator der Morphogenese und als potentiell Zielprotein der PKA angesehen (Stoldt *et al.*, 1997). Eine Deletion beider *EFG1*-Allele führt bei nahezu allen Induktionsbedingungen zu einem völligen Verlust der Hyphenbildung (Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000). Lediglich unter anaeroben Bedingungen und bei Matrixeinbettung zeigen *efg1*-Deletionsstämme sogar eine vermehrte Bildung von echten Hyphen (Sonneborn *et al.*, 1999; Riggle *et al.*, 1999). Diese unter anaeroben Bedingungen reprimierende Funktion von Efg1p wird vermutlich durch das Protein Czf1p, welches in Zwei-Hybrid-Analysen eine Interaktion mit Efg1p zeigt, reguliert (Giusani *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 1999). So führt die Überexpression von *CZF1* zu verstärkten und die Deletion zu einer verminderten Hyphenbildung.

Neben der MAPK-Kaskade und dem PKA-Weg sind noch andere Proteine bekannt, die den Wechsel zwischen der Hefe und der Hyphenform regulieren. Wichtige Aktivatoren werden von den Genen *RIM101*, *CPH2* und *TEC1* kodiert (Lane *et al.*, 2001a; Schweizer *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Alle diese Transkriptionsfaktoren zeigen eine aktivierende Funktion auf das filamentöse Wachstum. Deletionsstämme dieser Gene sind alle unterschiedlich stark in der Fähigkeit zur Hyphenbildung beeinträchtigt. Dem gegenüber stehen die Transkriptionsrepressoren Tup1p, Mig1p und Nrg1p (Braun und Johnson, 1997; Murad *et al.*, 2001a; Zaragoza *et al.*, 2000). Die reprimierende Wirkung auf den Wechsel zur Hyphenform wird durch die verstärkte Filamentbildung der Deletionsstämme deutlich. Die DNA-Bindenden Proteine Mig1p und Nrg1p vermitteln die notwendige Spezifität, indem sie den Repressor Tup1p zu unterschiedlichen Promotoren rekrutieren (Murad *et al.*, 2001b).

Der in Abb. 2 blau markierte Transkriptionsfaktor Efg1p wird als zentraler Regulator angesehen (Ernst, 2000). Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass einerseits die *efg1*-Deletion die stärksten Defekte in der Hyphenbildung zeigt, und andererseits dadurch, dass viele Phänotypen anderer Deletionsstämme durch Überexpression bzw. Deletion von *EFG1* komplementiert werden können. So kann beispielsweise der starke filamentöse Phänotyp der *tup1*-Mutante durch eine zusätzliche Deletion von *efg1* aufgehoben werden (Braun und Johnson, 2000).

## 1.5 Die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Efh1p

Das *EFG1*-Gen („Enhanced Filamentous Growth“) kodiert für ein 552 Aminosäuren großes Protein, welches in einem Screen als Auslöser von pseudohyphalen Wachstum in *S. cerevisiae* identifiziert wurde (Stoldt, 1997). Die Überexpression des Proteins in *S. cerevisiae* und in *C. albicans* führt zu stark elongierten Zellen. Sequenzanalysen des Proteins zeigten, dass Efg1p innerhalb einer etwa 100 Aminosäuren großen Region eine sehr hohe Homologie zu einer kleinen Gruppe von Transkriptionsfaktoren aufweist (siehe Abb. 3). Die Gruppe wurde anhand der Anfangsbuchstaben der zuerst beschriebenen Mitglieder als APSES-Gruppe (Asm1p, Phd1p, Sok2p, Efg1p, StuAp) bezeichnet. Diese lediglich in Pilzen identifizierten Transkriptionsfaktoren sind alle in morphologische Prozesse involviert. So reguliert Asm1p aus *Neurospora crassa* die Ascosporenreifung (Aramajo *et al.*, 1996), Phd1p und Sok2p regulieren in anta-

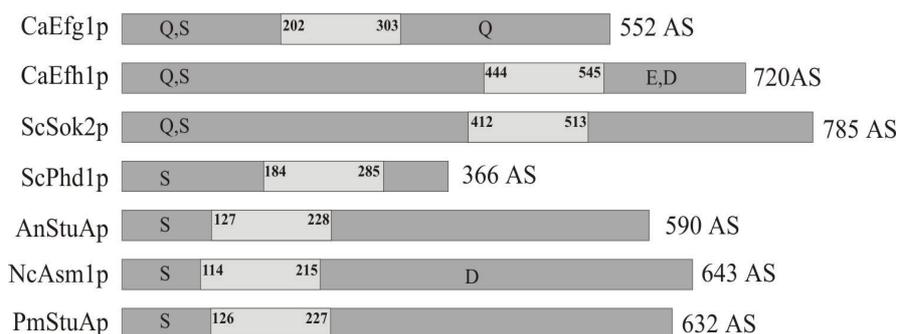


Abb. 3: Übersicht über die bisher charakterisierten APSES-Proteine. Die helle Box kennzeichnet die in allen Proteinen homologe APSES-Domäne. Die Zahlen geben die Position der APSES-Domäne an und die Buchstaben besonders häufig vorkommende Aminosäuren (Q=Glutamin, S=Serin, D=Asparaginsäure und E=Glutaminsäure).

gonistischer Weise die Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995) und StuAp aus *Aspergillus nidulans* steuert die Konidiophorenbildung (Miller *et al.*, 1992). Aufgrund der Tatsache, dass in *S. cerevisiae* mit Phd1p und Sok2p zwei APSES-Proteine vorhanden sind, wurde vermutet, dass auch *C. albicans* ein zweites APSES-Protein besitzt, welches durch anschließende Datenbankanalysen auch identifiziert werden konnte (Bockmühl, 2001). Wegen seiner Homologie wurde es als Efh1p (**EF**g1p **H**omologes) bezeichnet. Mit dem kürzlich identifizierten Protein PmStuAp aus *Penicillium marneffe* (Bornemann *et al.*, 2002), welches ebenfalls die Konidiophorenbildung reguliert, konnte ein weiteres Protein der APSES-Gruppe hinzugefügt werden. Außerhalb der APSES-Domäne weisen die Proteine der Gruppe keine Homologien auf. Auffällig ist lediglich der für Transkriptionsfaktoren typische hohe Anteil an Glutaminresten in Efg1p (19 %), Efh1p (15 %) und Sok2p (10 %) (siehe Abb. 3). Des Weiteren besitzen alle Proteine der APSES-Gruppe einen ungewöhnlich hohen Anteil an Serin-Resten, der zwischen 9 % für Efg1p und 15 % für Sok2p liegt.

Die APSES-Domäne ist durch eine zentrale basische Helix-Loop-Helix- (bHLH) Domäne charakterisiert, die von homologen Sequenzen flankiert wird (siehe Abb. 4). Die bHLH-Domäne ist ein gut untersuchtes DNA-Bindemotif vieler Transkriptionsfaktoren, wie z. B. der humanen Oncogene c-myc und c-max (Ferre-d'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994). Viele bHLH-Proteine, wie z. B. c-myc binden hierbei über die basische Region an eine als E-Box bezeichnete palindromische Sequenz (5'-CACGTG-3' bzw. 5'-CAGCTG-3') (Murre *et al.*, 1989; Ellenberger *et al.*, 1994). Die Helix-Loop-Helix-Domäne dient hingegen über die Interaktion der amphipathischen Helices zur Ausbildung von Hetero- und Homodimeren (Ma *et al.*, 1994). Durch die Variation des Dimerisierungspartner wird vielfach die DNA-Bindenspezifität der bHLH-Proteine modifiziert, so dass neben der E-Box auch andere Erkennungssequenzen gebunden werden (Robinson und Lopez, 2000; Ledent und Vervoort, 2001). Die DNA-Bindung einer E-Box durch Efg1p konnte bisher nur *in vitro* gezeigt werden (Leng *et al.*, 2001). Durch Zwei-Hybrid-Analysen konnte eine Interaktion von Efg1p mit dem Transkriptionsfaktor Czflp nachgewiesen werden (Giusani *et al.*, 2002). Bei der Einbettung von Zellen in Agar oder unter Sauerstoff limitierenden Bedingungen aktiviert dieses Zink-Finger-Protein die Ausbildung von filamentösen Zellen (Brown *et al.*, 1999; Setiadi, pers. Mitteilung).



Eine Besonderheit von *EFG1* ist das Vorhandensein von zwei unterschiedlich stark transkribierten Transkripten. Im Wildtyp-Stamm kann eine 3,2 kb große sowie eine etwa 20-fach geringer transkribierte 2,2 kb große mRNA detektiert werden (Tebarth *et al.*, 2003). Zellen der *white*-Phase (siehe 1.3.4) bilden lediglich die größere mRNA und Zellen der *opaque*-Phase nur das kleinere *EFG1*-Transkript (Srikantha *et al.*, 2000). Northernanalysen zeigten, dass das 3,2 kb-große *EFG1*-Transkript parallel zur Hypheninduktion herunterreguliert wird (Stoldt *et al.*, 1997). Diese reprimierte Expression konnte auf eine negative Autoregulation des *EFG1*-Gens zurückgeführt werden (Tebarth *et al.*, 2003).

Eine weitere Besonderheit von Efg1p ist das unerwartete Laufverhalten in Immunoblot-Analysen. Während das Protein bei heterologer Expression in *Escherichia coli* bei der errechneten Größe von etwa 60kDa detektiert werden konnte (Doedt, 2000), erscheint das Protein bei Expression in *S. cerevisiae* oder *C. albicans* als Dreifachbande bei einer Laufhöhe um 90 kDa (Sonneborn, 1999). Die Hypothese, dass dieses Laufverhalten auf posttranslationale Modifizierungen zurückzuführen ist, konnte allerdings bis jetzt nicht bestätigt werden.

Die genauen Funktionen von Efg1p und Efh1p sind bis heute ungeklärt. Durch die Deletions- und Überexpressionsphänotypen von *EFG1* und *EFH1* wird eine Beteiligung an der Regulation des dimorphen Wachstums deutlich. Für beide Transkriptionsfaktoren konnten jedoch keine direkten Zielgene identifiziert werden. Für einige wenige hyphenspezifischer Gene wie die Zellwand kodierenden Gene *HWPI* und *ALSI* oder die sekretierten Proteine *SAP4* und *SAP6* konnte zwar eine Abhängigkeit ihrer Expression von Efg1p nachgewiesen werden, eine direkte Aktivierung über Bindung des Promotors konnte jedoch für kein Gen gezeigt werden (Sohn *et al.*, 2003, Fu *et al.*, 2002, Felk *et al.*, 2002).

Über das 720 AS große Efh1p ist im Gegensatz zu Efg1p wenig bekannt. Bei Überexpression des *EFH1*-Gens werden ebenfalls wie bei *EFG1*-Überexpression filamentöse Zellen gebildet (Bockmühl, 2001). Des Weiteren forciert die *EFH1*-Überexpression in Zellen der *opaque*-Phase wie auch die *EFG1*-Überexpression den Wechsel zur *white*-Form (Tebarth, 2001). Durch eine Fusion an das Grün-fluoreszierende-Protein konnte gezeigt werden, dass Efh1p kernlokalisiert ist (Krishnamurthy, pers. Mitteilung). Obwohl bei Überexpression die Beteiligung von Efh1p an der Regulation des dimorphen Wachstum deutlich wird, konnten bei der Deletion beider *EFH1*-Allele kein Phänotyp beobachtet werden (Krishnamurthy, pers. Mitteilung). Lediglich in Kombination mit einer zusätzlichen Deletion von *EFG1* konnte ein synthetischer Phänotyp beobachtet werden. So wird der hyperfilamentöse Phänotyp der *efg1*-Mutante unter anaeroben Bedingungen durch die zusätzliche Deletion von *EFH1* verstärkt (Stempel, 2003).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der PKA-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für den Dimorphismus und die Virulenz von *C. albicans*. Der Transkriptionsfaktor Efg1p ist hierbei für die Aktivierung und Repression hefenspezifischer und hyphenspezifischer Gene verantwortlich. Mit dem Transkriptionsfaktor Efh1p konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, welches das dimorphe Wachstum reguliert. Ziel dieser Arbeit war es, Zielgene der Transkriptionsfaktoren Efg1p und Efh1p zu identifizieren sowie die Funktionen der beiden Proteine beim Dimorphismus von *C. albicans* aufzuklären.

1. In einem ersten Teil sollte untersucht werden, ob das autoregulierte *EFG1*-Gen selbst ein direktes Zielgen von Efg1p ist. Hierzu sollte eine direkte Interaktion mit dem *EFG1*-Promotor mittels Chromatinimmunpräzipitation gezeigt werden. Ebenfalls sollte die Rolle der Histon-deacetylase Sin3p im Bezug zur *EFG1*-Autoregulation geklärt werden.

2. Um Hinweise auf durch Efg1p und Efh1p regulierte Gene zu erhalten, sollten mit Hilfe der DNA-Microarray-Technologie Transkriptomanalysen durchgeführt werden. Da die Rolle beider Proteine in der Regulation des Hefe-Hyphe-Wechsels vermutet wird, sollten die Transkriptomanalysen einerseits unter Bedingungen, die die Hefeform stabilisieren und andererseits unter hypheninduzierenden Bedingungen durchgeführt werden.

3. Die Aktivierung bzw. Reprimierung von Zielgenen erfolgt durch eine spezifische Bindung von DNA-Sequenzen innerhalb der Promotoren dieser Gene. Das so genannte MCB-Element stellt eine mögliche DNA-Sequenz dar, die eine Rolle bei der Expression von Efg1p-Zielgenen haben kann. Mittels Ein-Hybrid-Experimenten und Promotorstudien sollte überprüft werden, ob einerseits das zweite APSES-Protein Efh1p ebenfalls an ein MCB-Element binden kann, und andererseits ob identifizierte Zielgene von Efg1p *in vivo* über MCB-Elemente reguliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Laborchemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Braunschweig), Biorad (München), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Calbiochem (Bad Soden), Dianova (Hamburg), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Kodak (New Haven), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Oxoid (Wesel), Pharmacia (Freiburg), Pierce (Rockford), Promega (Madison), Qiagen (Hilden), Riedel-De Haen (Hannover), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Whatman (Maidstone, GB). Soweit nicht anders vermerkt wurden Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.

### 2.2 Stämme und Medien

#### 2.2.1 Bakterien-Stämme

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 $\alpha$ F <sup>c</sup>	F <sup>c</sup> [ $\Phi$ 80 ( $\Delta$ lacZ) M15] $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> supE44 thi-1 gyrA relA	Hanahan, 1983 Woodcock <i>et al.</i> , 1989
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 lac[F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> )]	Bullock <i>et al.</i> , 1987

#### 2.2.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

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

Festen Nährböden wurde 2 % Agar zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C. Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenz wurden dem Medium nach dem Autoklavieren Antibiotika zugesetzt, Ampicillin in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml und Kanamycin in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml. Selektion auf lacZ-Aktivität erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu$ l einer IPTG / X-gal Lösung auf die Agarplatte. Die Stammlösung enthielt 10 mg X-Gal und 2,4 mg IPTG / ml DMF.

### 2.2.3 Hefe-Stämme

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
SC5314	prototroph	Fonzi und Irwin, 1993
CAF2-1	<i>URA3/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAI8	<i>ade2::hisG/ade2::hisG ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
HLC52	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	Lo <i>et al.</i> , 1997
BCA 09-04	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	Braun und Johnson, 2000
HLC74	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG (EFG1)</i>	Lo <i>et al.</i> , 1997
C4/d6-3	wie CAI4, aber <i>efh1::hisG/efh1::hisG-URA3-hisG</i>	Krishnamurthy, pers. Mitteilung
C4/d63-1	wie CAI4, aber <i>efh1::hisG/efh1::hisG</i>	Krishnamurthy, pers. Mitteilung
H/1.22	wie HLC67, aber <i>efh1::hisG/efh1::hisG-URA3-hisG</i>	Krishnamurthy, pers. Mitteilung
SFC4	wie CAI4, aber <i>sin3::hisG/sin3::hisG</i>	Dominguez, pers. Mitteilung
C4-TD1	wie CAI4, aber <i>EFG1-GFP (URA3)</i> (integriertes PCR-Fragment mit den Primern EFG1-GFP-F1 und EFG-GFP-R1-2)	diese Arbeit
C4SAPp(550)	wie CAI4, aber <i>SAP2p(550 bp)-RLUC (URA3)</i> [pSAP2p-550 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
C4SAPp	wie CAI4, aber <i>SAP2p-RLUC (URA3)</i> [pSAP2p-1050 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
C4TD60	wie C4SAPp(550), aber $\Delta$ MCB ( <i>URA3</i> ) [pTD60 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
C4TD61	wie C4SAPp, aber $\Delta$ MCB ( <i>URA3</i> ) [pTD61 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
HSAPp(550)	wie CAI4, aber <i>SAP2p(550 bp)-RLUC (URA3)</i> [pSAP2p-550 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
HSAPp	wie CAI4, aber <i>SAP2p-RLUC (URA3)</i> [pSAP2p-1050 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
HTD60	wie HSAPp(550), aber $\Delta$ MCB ( <i>URA3</i> ) [pTD60 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
HTD61	wie HSAPp, aber $\Delta$ MCB ( <i>URA3</i> ) [pTD61 ( <i>NcoI</i> ) integriert in <i>RPS10</i> ]	diese Arbeit
C4TD72a	wie CAI4, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
C4TD81a	wie C4TD72a, aber $\Delta$ MCB ( <i>URA3</i> ) [pTD81 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
C4TD82	wie C4TD72a, aber DEL1 ( <i>URA3</i> ) [pTD82 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
C4TD83	wie C4TD72a, aber DEL2 ( <i>URA3</i> ) [pTD83 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
C4TD84	wie C4TD72a, aber DEL3 ( <i>URA3</i> ) [pTD84 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
C4TD85	wie C4TD72a, aber DEL4 ( <i>URA3</i> ) [pTD85 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
HTD72a	wie HLC67, aber <i>FLO1p-RLUC (URA3)</i> [pTD72 ( <i>Bst1107I</i> ) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit

HTD81a	wie HTD72a, aber $\Delta$ MCB ( <i>URA3</i> ) [pTD81 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
HTD82	wie HTD72a, aber DEL1 ( <i>URA3</i> ) [pTD82 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
HTD83	wie HTD72a, aber DEL2 ( <i>URA3</i> ) [pTD83 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
HTD84	wie HTD72a, aber DEL3 ( <i>URA3</i> ) [pTD84 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
HTD85	wie HTD72a, aber DEL4 ( <i>URA3</i> ) [pTD85 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>FLO1p</i> ]	diese Arbeit
C4LR6	wie CAI4, aber <i>EFH1p-RLUC</i> ( <i>URA3</i> ) [pLR6 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>EFH1p</i> ]	diese Arbeit
HLR6	wie HLC67, aber <i>EFH1p-RLUC</i> ( <i>URA3</i> ) [pLR6 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>EFH1p</i> ]	diese Arbeit
C4/d6-3LR6	wie C4/d6-3, aber <i>EFH1p-RLUC</i> ( <i>URA3</i> ) [pLR6 ( <i>Bst</i> 1107I) integriert in <i>EFH1p</i> ]	diese Arbeit
C4pBT100	wie CAI4, aber <i>EFG1p-RLUC</i> ( <i>URA3</i> ) [pBT100 ( <i>Hpa</i> I) integriert in <i>EFG1p</i> ]	diese Arbeit
HpBT100	wie HLC67, aber <i>EFG1p-RLUC</i> ( <i>URA3</i> ) [pBT100 ( <i>Hpa</i> I) integriert in <i>EFG1p</i> ]	diese Arbeit
C4/d6-3 BT100	wie C4/d6-3, aber <i>EFG1p-RLUC</i> ( <i>URA3</i> ) [pBT100 ( <i>Hpa</i> I) integriert in <i>EFG1p</i> ]	diese Arbeit

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
PJ69-4A	<i>MAT<math>\alpha</math> trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4<math>\Delta</math> gal80<math>\Delta</math> LYS2::GAL1p-HIS3 GAL2p-ADE met2::GAL7p-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
BY 600	<i>MAT<math>\alpha</math> swi6 TRP1-197 ade2 ho::lacZ ura3 his3 leu2-3 -112 trp1-1 can1-100 met-</i>	Lowndes <i>et al.</i> , 1992
KA311B	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 his3 trp1</i>	Irie <i>et al.</i> , 1993
YMN101	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 his3 trp1 agp1<math>\Delta</math> ::HIS3</i>	Mizushima <i>et al.</i> , 1999
JD53	<i>MAT<math>\alpha</math> ADE2 leu2-3, 112 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Dohmen <i>et al.</i> , 1995
IS19	<i>MAT<math>\alpha</math> ADE2 leu2-3, 112 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>63 ura3-52 rub1<math>\Delta</math> ::HIS3</i>	Schwienhorst <i>et al.</i> , 2000
IS30	<i>MAT<math>\alpha</math> ADE2 leu2-3, 112 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>63 ura3-52 ulp2<math>\Delta</math> ::HIS3</i>	Schwienhorst <i>et al.</i> , 2000
JD90-1a-1ts9	<i>MAT<math>\alpha</math> ADE2 leu2-3, 112 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>63 ura3-52 uba2<math>\Delta</math> ::HIS3 uba2-ts9-CEN/LEU2</i>	Schwienhorst <i>et al.</i> , 2000

## 2.2.4 Medien und Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium)	: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose
YP4D	: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 4 % Glukose
SD (Minimalmedium)	: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose; pH 6,9 mit NaOH eingestellt

SCAA	:0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Casaminosäuren; pH 6,9 mit NaOH eingestellt
YCB-BSA	: 2,34 % Yeast Carbon Base, 0,4 % BSA, pH4,0

Aminosäuren wurden bei Bedarf wie bei Zimmermann (1975) beschrieben zugegeben. Zur Herstellung fester Medien wurde jeweils 1,5 % Agar zugegeben. Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30°C. Transformationen von Sphäroplasten wurden auf SD-Medium mit 1 M Sorbitol in Topagar ausplattiert.

### 2.2.5 Hypheninduktion bei *C. albicans* in flüssigen Medien

Zur Induktion von Hyphen mittels Serum wurden über Nacht gewachsene Zellen mit Wasser gewaschen und dann nach einer einstündigen Inkubation bei 30°C mit einer  $OD_{600} = 0,1$  in auf 37°C vorgewärmtes Induktionsmedium (1 % Yeast Extract, 2 % Pepton, 5 % Pferdeserum) überführt. Die Quantifizierung der Hyphen erfolgte durch Auszählen von 200 Zellen in 20 minütigen Abständen.

### 2.2.6 Hypheninduktion bei *C. albicans* auf festen Medien

Zur Hypheninduktion auf festen Medien wurden Serumplatten verwendet. Diese enthielten 2 % Agar und 10 % Pferdeserum. Die Hyphenbildung wurde bei 37°C induziert und wurde nach 3-4 Tagen fotografisch dokumentiert.

Die Hypheninduktion konnte auch auf „Mangelmedium“ erfolgen. Hierzu wurden „Spider-Platten“ (Liu *et al.*, 1994) bestehend aus 1 % Nutrient Broth, 1 % Mannitol, 0,2 %  $K_2HPO_4$  und 1,35 % Agar hergestellt. Die Inkubation der Stämme erfolgte für 2-5 Tage bei 37°C.

## 2.3 Plasmide und Primer

### 2.3.1 Basisplasmide

Tab. 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-, *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Plasmide

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pUC18	Amp <sup>R</sup> / kein	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19	Amp <sup>R</sup> / kein	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC21	Amp <sup>R</sup> / kein	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Viera und Messing, 1991
pMOS-BLUE	Amp <sup>R</sup> / kein	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Fa. Amersham
p1367/1	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / kein	<i>CaURA3</i> -Gen in pUC18	Losberger und Ernst, 1989

pRC2312	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>CaURA3</i> -markierter <i>CaARS</i> -Vektor	Cannon <i>et al.</i> , 1992
pBT3a	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>CaURA3</i> -markierter <i>CaARS</i> -Vektor	Tebarth, 2001
pBT-4	Amp <sup>R</sup> , <i>CaADE2</i> / <i>CaARS</i>	<i>CaADE2</i> -markierter <i>CaARS</i> -Vektor	Tebarth, 2001
pBI-1	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>CaPCK1p</i> in pRC2312	Rademacher, 1998
pDB30	Amp <sup>R</sup> / kein	<i>EFH1-ORF</i> in pUC18	Bockmühl, 2001
pDB33	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	<i>EFH1-GAL4-AD</i> -Fusion in pGADc1	Bockmühl, 2001
pDB35	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-EFH1</i> in pBI-1	Bockmühl, 2001
pGFP-URA	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / kein	<i>URA3</i> -markierter Vektor zur c-terminalen GFP-Fusion	Gerami-Nejad, 2001
pRL-null	Amp <sup>R</sup> / kein	<i>RLUC</i> -Gen aus <i>R. reniformis</i>	Fa. Promega
pRC2312P-H	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-EFG1</i> -Fusion in pRC2312	Sonneborn, 1999
pBI-HAHYD	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-HA-EFG1</i> -Fusion in pRC2312	M. Gerads, pers. Mitteilung
YcpIF17Bist	Amp <sup>R</sup> , <i>ScTRP1</i> / <i>CEN/ARS</i>	<i>GAL1p-HA-EFG1</i> -Fusion	Strickling, 1996
pAPEA	Amp <sup>R</sup> , <i>CaADE2</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-HA-EFG1</i> -Fusion in pBT4	M. Gerads, pers. Mitteilung
pAPE(2)ADE	Amp <sup>R</sup> , <i>CaADE2</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-EFG1</i> -Fusion in pBT4	M. Gerads, pers. Mitteilung
pBI-CaSin3FLAG	Amp <sup>R</sup> , <i>CaADE2</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-FLAG-SIN3</i> -Fusion in pRC2312	M. Gerads, pers. Mitteilung
pGADc1	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	<i>ADH1p-Gal4</i> -Aktivierungs-domäne in <i>LEU2</i> markiertem Vektor	James <i>et al.</i> , 1996
pGBDc1	Amp <sup>R</sup> , <i>ScTRP1</i> / 2 $\mu$	<i>ADH1p-GAL4</i> -Bindedomäne in <i>TRP1</i> markiertem Vektor	James <i>et al.</i> , 1996
pDB16	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	<i>EFG1-GAL4-AD</i> -Fusion in pGADc1	Bockmühl, 2001
pGB-Sin3	Amp <sup>R</sup> , <i>ScTRP1</i> / 2 $\mu$	<i>SIN3-GAL4-BD</i> -Fusion in pGBDc1	M. Gerads, pers. Mitteilung
pINS	Amp <sup>R</sup> , <i>ScTRP1</i> / 2 $\mu$	Verkürzte <i>SIN3-GAL4-BD</i> -Fusion in pGBDc1	C. Lopez, pers. Mitteilung
p1877CaEFG1	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>ACT1p-EFG1</i> -Fusion in pRC2312	M. Gerads, pers. Mitteilung
pJS205XXB	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / 2 $\mu$	<i>CYC1p-lacZ</i> -Fusion	Schüller <i>et al.</i> , 1992
pBT100	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	<i>EFG1p-RLUC</i> -Fusion in p1367/1	Tebarth, 2001
pYW105b	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>ACT1p</i> in pBT3a	Weber, 2001
p1877CaEFG1	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>ACT1p-EFG1</i> -Fusion in pYW105b	M. Gerads, pers. Mitteilung
pSAP2p-550	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>SAP2p(550 bp)-RLUC</i> -Fusion mit <i>CaRPS10</i> -Gen	B. Hube, pers. Mitteilung

pSAP2p-1050	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>SAP2p</i> (1050 bp)- <i>RLUC</i> -Fusion mit <i>CaRPS10</i> -Gen	B. Hube, pers. Mitteilung
pJA-24	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>CaPCK1p</i>	Jiang <i>et al.</i> , 2001
pJA-PP2C	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-PTC7</i> -Fusion	Jiang <i>et al.</i> , 2001
pJA-SIT4	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	<i>PCK1p-SIT4</i> -Fusion	Jiang <i>et al.</i> , 2001

### 2.3.2 Konstruierte Plasmide

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pTD11	Amp <sup>R</sup> , <i>ScTRP1</i> / <i>CEN/ARS</i>	2,2 kb- <i>Bam</i> HI Fragment aus pDB30 ( <i>EFH1</i> -ORF) ligiert in YCpIF17 ( <i>Bam</i> HI)
pTD12	Amp <sup>R</sup> / kein	2,2 kb PCR-Fragment mit Primern HAEFH1(ATG)+ <i>Hinc</i> II und HAEFH(STOP)+ <i>Hinc</i> II von pTD11 ligiert in pUC18 ( <i>Sma</i> I)
pTD13	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	2,2 kb <i>Hinc</i> II-Fragment aus pTD12 ( <i>HA-EFH1</i> ) ligiert in pBI-1 ( <i>Bgl</i> II -Klenow Fill-In)
pTD17	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	Durch Mutagenese wurde eine <i>Sma</i> I-Schnittstelle in den Vektor pDB33 mit den Primern pGAD-SmaIa und pGAD-SmaIb eingefügt
pTD18	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	Die <i>Gal4-AD</i> aus pTD17 wurde durch Religation des 8,5 kb <i>Sma</i> I-Fragment aus pTD17 entfernt.
pTD19-1	Amp <sup>R</sup> / kein	PCR-Fragment der 5'RACE des <i>EFH1</i> -Gens
pTD19-2	Amp <sup>R</sup> / kein	PCR-Fragment der 5'RACE des <i>EFH1</i> -Gens
pTD19-3	Amp <sup>R</sup> / kein	PCR-Fragment der 5'RACE des <i>EFH1</i> -Gens
pTD22	Amp <sup>R</sup> , <i>ScURA3</i> / 2 $\mu$	Zum Einfügen einer <i>Mlu</i> I-Schnittstelle wurden die Oligonukleotide 1xMCB-Ph, a und 1xMCB-Ph, b hybridisiert und in den Vektor pJS205XXB ( <i>Bam</i> HI) ligiert
pTD60	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	Deletion der <i>Mlu</i> I-Schnittstelle im Vektor pSAP2p-550 mit den Primern SAP2p-MluI,a und SAP2p-MluI,b
pTD61	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	Deletion der <i>Mlu</i> I-Schnittstelle im Vektor pSAP2p-1050 mit den Primern SAP2p-MluI,a und SAP2p-MluI,b
pTD69	Amp <sup>R</sup> / kein	1,9 kb PCR-Fragment des <i>FLO1p</i> mit den Primern 5185p, hin und 5185p, her ligiert in pMOS-Blue ( <i>Eco</i> RV)
pTD70	Amp <sup>R</sup> / kein	1,9 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pTD69 ( <i>FLO1p</i> ) ligiert in pUC21 ( <i>Bam</i> HI)
pTD71	Amp <sup>R</sup> / kein	0,9 kb <i>Nhe</i> I, <i>Xba</i> I-Fragment aus pRL-null ( <i>RLUC</i> ) ligiert in pTD70 ( <i>Xba</i> I)
pTD72	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / kein	2,9 kb <i>Spe</i> I-Fragment aus pTD71 ( <i>FLO1p-RLUC</i> ) ligiert in p1367/1 ( <i>Xba</i> I)
pTD73	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	T248A-Austausch in pDB16 mit Primern T248A-1 und T248A-2
pTD75	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	T248E-Austausch in pDB16 mit Primern T248E-1 und T248E-2
pTD77	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	L241R-Austausch in pDB16 mit Primern L241R-1 und L241R-2
pTD79	Amp <sup>R</sup> , <i>ScLEU2</i> / 2 $\mu$	R262L-Austausch in pDB16 mit Primern R262L-1 und R262L-2
pTD81	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	Deletion der <i>Mlu</i> I-Schnittstelle im Vektor pTD72 mit den Primern 5185-MCBa und 5185-MCBb
pTD82	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	Deletion 1 innerhalb des <i>FLO1p</i> in pTD72 mit den Primern Del1a und Del1b

pTD83	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	Deletion 2 innerhalb des <i>FLO1p</i> in pTD72 mit den Primern Del2a und Del2b
pTD84	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	Deletion 3 innerhalb des <i>FLO1p</i> in pTD72 mit den Primern Del3a und Del3b
pTD85	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	Deletion 4 innerhalb des <i>FLO1p</i> in pTD72 mit den Primern Del4a und Del4b
pTD86	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / <i>CaARS</i>	2,4 kb <i>HindIII</i> -Fragment (Klenow Fill-In) aus pDB16 ( <i>GAL4-AD-EFG1</i> ) ligiert in pYW105b ( <i>BamHI</i> -Klenow Fill-in)
pLR1	Amp <sup>R</sup> / Kein	2,0 kb PCR-Fragment auf genomischer DNA mit den Primern EFH1p-5' und EFH1p-3' ligiert in pUC18 ( <i>SmaI</i> )
pLR3	Kan <sup>R</sup> / Kein	2,0 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pLR1 ( <i>EFH1p</i> ) ligiert in pUK21 ( <i>BamHI</i> )
pLR4	Kan <sup>R</sup> / Kein	0,9 kb <i>NheI</i> , <i>XbaI</i> -Fragment aus pRL-null ( <i>RLUC</i> ) ligiert in pLR3 ( <i>XbaI</i> )
pLR6	Amp <sup>R</sup> , <i>CaURA3</i> / Kein	3,1 kb <i>SpeI</i> -Fragment aus pLR4 ( <i>EFH1p-RLUC</i> ) ligiert in p1367/1 ( <i>XbaI</i> )

### 2.3.3 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
HAEFH1(ATG)+HincII	5'-TTAGTTAACTTATATGAGTCGATACCCATAC-3'
HAEFH(STOP)+HincII	5'-TTAGTCAACTTCATAATGTTTTGTGAAC-3'
ACT1p(313), hin	5'-GTAGTGTGTGTGCACTGCC-3'
ACT1p(313), her	5'-CCACCGTCCATTTTGAATGA-3'
EFH1p(268), hin	5'-GGGAATCTATATCACTGATC-3'
EFH1p(268), her	5'-CCATTCATTTATAAAATATGTG-3'
PCK1p(116), hin	5'-CCCGGGACAAGGGAAG-3'
PCK1p(116), her	5'-CAAGGGAATTTGATGGTG-3'
EFG1p(234), hin	5'-GACCCAAATCTTGTAATCTTG-3'
EFG1p(234), her	5'-CCTTTTGCAAAGGTTTGGATC-3'
CHIP1F	5'-GTAACGTCAATTATGCAAATATTGGGG-3'
CHIP1R	5'-GAATACGAAAAATGGCGGACTCAGG-3'
EFH-inner	5'-CTCGATGTGTCATAATACC-3'
EFH-outer	5'-GACCAGGAATGTGATCTGAG-3'
EFH-outer-2	5'-GATGGTGGTGAATGGGTTGG-3'
EFH1p-5'	5'-TTAGGATCCAGTTTACCCGAAATCTGTG-3'
EFH1p-3'	5'-TTAGGATCCGTGAATATACTTATAACGCG-3'
PFK1, hin	5'-CTCCTCCGACGCAATC-3'
PFK1, her	5'-CCCTTCATAACCTTCG-3'
FBA1, hin	5'-CCGGTGTATCTACGG-3'
FBA1, her	5'-CACCATTCTTGATAGC-3'
FUM12.3, hin	5'-CCTTGACACTGTAGCTGC-3'
FUM12.3, her	5'-GCTATCGAGTCTACAAAGC-3'
HHF22, hin	5'-CAGGTACCGGTAGAGG-3'
HHF22, her	5'-CCACCGAAACCATAACAAGG-3'
1xMCB-PH,a	5'-TCGAGCGGATCCCAGACGCGTGTAGATCTAGCTC-3'
1xMCB-PH,b	5'-TCGAGAGCTAGATCTACACGCGTCTGGGATCCGC-3'
5185p, hin	5'-ATTGGATCCTCGACTCATCCACCCACCC-3'
5185p, her	5'-ATGGATCCTGCGAGTGTGAATTAATTG-3'
5185-MCBa	5'-CGCATCTCCGAATTTGTAAACCCAACAACCAACAGC-3'
5185-MCBb	5'-GCTGTTGGTTGTTGGGTTTACAAATTCGGAGATGCG-3'
Del1a	5'-CAACAGCGTTCTACATTCGCCCCGAGTTCAAATAAAG-3'
Del1b	5'-CTTTATTTGAACTCGGGCGAATGTAGAACGCTGTTG-3'
Del2a	5'-CACTACCAACAAGAACAAGCGGAAAATCCCAACAGC-3'

Del2b	5'-GCTGTTGGGATTTTCCGCTTGTCTTGTGGTAGTG-3'
Del3a	5'-CTTGAAGGTATGGATTGGCCCACCCACCCACTCAC-3'
Del3b	5'-GTGAGTGGGTGGGTGGGCCAATCCATACCTTCAAG-3'
Del4a	5'-CCATTCTACCAACAACCGGGACTAATTAATCATC-3'
Del4b	5'-GATGATTAATTAGTCCCGGTTGTTGGTAGAATGG-3'
SAP2p-MluI,a	5'-CCTTTCTAGTACCAATAATTCGCGTTTTAATTCCAATCATG-3'
SAP2p-MluI,b	5'-CATGATTGGAATTAACGCGAATTATTGGTACTAGAAAGG-3'
T248A-1	5'-CAATGTGGCCCAAATGGCACGTGGTAGAAGAG-3'
T248A-2	5'-CTCTTCTACCACGTGCCATTTGGGCCACATTG-3'
T248E-1	5'-CAATGTGGCCCAAATGGAACGTGGTAGAAGAG-3'
T248E-2	5'-CTCTTCTACCACGTTCATTTGGGCCACATTG-3'
L241R-1	5'-GATCAACGGAACCAACGGCTCAATGTGGCCC-3'
L241R-2	5'-GGGCAACATTGAGCCGTTTGGTTCCGTTGATC-3'
R262L-1	5'-CAGAAAAGGTGTTACACGTTGTG-3'
R262L-2	5'-CACAACGTGTAACACCTTTTCTG-3'
pGAD-SmaIa	5'-GAGAAAGGTGCAATTCGCGGTACCGCCGCC-3'
pGAD-SmaIb	5'-GGCGGCGGTACCGGAATTCGACCTTTCTC-3'
5185pVer	5'-CCAACAGCAAGAACAAGAG-3'
EFG-MAJ-prom1	5' CCATCTTACCTCGGATCTC 3'
SK-1	5'-GGCCCACCACTGCGGACCAG-3'
EFG1-GFP-F1	5'-CAGTTCACCCTTCACCCCAACAACATCAAGCTAATCAATCGT TGTTGCCAAAGAAGAAAAGGGTGGTGGTTCTAAAGGTGAAGAATTATT- 3'
EFG1-GFP-R1-2	5'-ATGATCTATACTATTTCTTTTTTTATTATTTTCTCTCTAATTT AGAAGGAACTTTCCAATCATTGTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG- 3'

## 2.4 Präparation von Nukleinsäuren

### 2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für analytische Zwecke genutzte Plasmid-DNA wurde nach der „Mini-Lysat“-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) isoliert. DNA für präparative Zwecke wurde aus 50 ml LB-Kulturen mit Anionenaustauscher -Säulen der Firma Qiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers isoliert.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

### 2.5.1 Restriktionsendonukleolyse

Restriktionsenzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

### 2.5.2 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Um kohäsiv geschnittene DNA-Enden nach einer Restriktionsendonukleolyse in stumpfe Enden umzuwandeln, wurde eine Auffüllreaktion durchgeführt. Hierzu wurden 5'-überhängende DNA-Enden durch zugegebene dNTP (0,5 µl einer 25 mM Lösung) und Klenow-Fragment (3 U) in 30 min bei 37°C zu Doppelsträngen ergänzt. Nach Inkubation von 15 min bei 72°C und anschließender Phenol-/Chloroformextraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

### 2.5.3 Phosphatasereaktion

Um für Klonierungszwecke eine Rezirkularisierung von geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden diese am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde nach der Restriktionsendonukleolyse ein Überschuss an alkalischer Phosphatase zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgereinigt.

### 2.5.4 Ligation

Ligationsreaktionen zur Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle (Insert + Vektor in äquimolaren Konzentrationen) wurden in einem Volumen von 20 µl mit Ligationspuffer (66 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP) und 1 U T4 DNA-Ligase bei glatten Enden über Nacht bei 16°C und Ansätze mit überstehenden Enden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.5.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Je nach Größe wurden die DNA-Fragmente in 0,7 – 2 %igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989) Die DNA wurde nach der Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

### 2.5.6 Größenstandard für DNA

Als Größenstandard für DNA wurde DNA des Phagen Lambda genutzt (MBI-Fermentas), welche mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten wurde. Es entstehen dadurch DNA-Fragmente mit folgender Größe (bp): 24756, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125.

### 2.5.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des „QiaexII DNA Gel Extraction“-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben von Agaroseresten befreit

### 2.5.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktion  $E_{260} = 1$  entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA sowie 33  $\mu\text{g/ml}$  ss DNA (Müller *et al.*, 1993)

### 2.5.9 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die zur Amplifizierung von DNA dienende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Mullis und Fallona (1987) wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Die Annealingtemperaturen, sowie die Elongationszeit wurden den eingesetzten Primern, bzw. dem erwarteten PCR-Fragment angepasst. PCR-Fragmente wurden mit dem „QIAquick PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt.

#### 2.5.9.1 Multiplex-PCR

Zur Analyse von Co-Immünpräzipitierter DNA von ChIP-Experimenten (siehe 2.6.3) wurden in einer PCR-Reaktion bis zu sechs Primer in einem Ansatz eingesetzt. Die Amplifikation der Produkte erfolgte in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  mit Hilfe der Taq-Polymerase (Roche, Mannheim). Es wurde folgende PCR-Parameter genutzt:

1. 5 min 95°C
  2. 30 sec 95°C
  3. 30 sec 52°C
  4. 45 sec 68°C
- } x 28

Tab. 7: Übersicht über die eingesetzten Primer und die Größe der generierten Fragmente

Fragmentname	Primer # 1	Primer # 2	Fragmentgröße
<i>ACT1</i>	Act1p(313), hin	Act1p(313), her	313 bp
<i>EFG1p</i>	Efg1p(234), hin	Efg1p(234), her	234 bp
<i>ALS3p</i>	CHIP1F	CHIP1R	140 bp
<i>PCK1p</i>	PCK1p(116), hin	PCK1p(116), her	116 bp

### 2.5.9.2 Kolonie-PCR

Zur Verifizierung von DNA- Integrationsereignissen in *C. albicans* wurde eine PCR auf ganzen Zellen durchgeführt. Es wurde etwas Kolonie in 15 µl 0,02 M NaOH-Lösung resuspendiert, für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. In die folgende PCR wurden 2 µl der Suspension bei einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Es wurde die von Roche bezogene HighFidelity-Polymerase eingesetzt und für die PCR den Angaben des Herstellers gefolgt.

### 2.5.9.3 Mutagenese-PCR

Punktmutationen sowie Deletionen wurden mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Fa. Stratagene generiert. Die hierzu verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.3 angegeben.

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 DNA-Microarrays

Die Methode der DNA-Microarrays ermöglicht den Vergleich von genomweiten Genexpressionsprofilen. Es können Gene identifiziert werden können, welche nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert sind. Hierbei wird aus Gesamt-RNA mittels einer Reversen-Transkriptase-Reaktion eine mit den Fluorochromen Cy3 oder Cy5 markierte Komplementär-DNA (cDNA) hergestellt. Die unterschiedlich markierte cDNA von zwei zu vergleichenden Proben wird vereinigt und zur Hybridisierung auf einen DNA-Chip gegeben. Auf diesem Glasobjektträger ist die DNA der zu untersuchenden offenen Leseraster (ORF) fixiert. Durch scannen der DNA-Chips mit zwei verschiedenen Wellenlängen (532nm für Cy3 und 640 nm für Cy5) erfolgt anschließend eine Quantifizierung der hybridisierten cDNA. Der Vergleich der Signalintensitäten der beiden Wellenlängen liefert dann eine Aussage über die Regulation einzelner Gene.

#### 2.6.1.1 Anzucht der Zellen

Für den Vergleich von Deletionsmutanten mit dem Wildtyp, wurden die Stämme ausgehend von einer Übernachtskultur in 50 ml frisches YPD-Medium auf eine  $OD_{600}=0,05$  angeimpft. Die Zellen wurden dann bis zu einer  $OD_{600}=0,6$  wachsen gelassen und durch Zentrifugation geerntet (5 min, 3.500 Upm). Beim Vergleich der Stämme unter hypheninduzierenden Bedingungen wurden die Zellen bis zu einer  $OD_{600}=0,5$  wachsen gelassen und dann durch Zentrifugation geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml auf 37°C vorgewärmtes YP-Medium mit 10% Serum resuspendiert. Die Zellen wurden nun für weitere 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend geerntet.

Die Überexpressionsstämme wurden zur Selektion der Plasmide und zur Induktion des *PCK1*-Promotors in SCAA-Medium angezogen. Sie wurden ebenfalls bis zu einer  $OD_{600}=0,6$  angezogen und anschließend geerntet.

### 2.6.1.2 Präparation von RNA aus *C. albicans*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Zellen einer 50 ml Kultur bei einer  $OD_{600}=0,6$  durch Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet im verbleibenden Überstand resuspendiert. Die Zellsuspension wurde langsam in flüssigen Stickstoff getropft, so dass gefrorene Zellkugeln entstanden. Die gefrorenen Zelltropfen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die gefrorenen Zelltropfen zusammen mit einem Metallkugelchen ( $\varnothing$  7mm) in ein vorgekühltes Teflongefäß gegeben und in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) für 2 min bei 2.600 Upm gerüttelt. Der Zellstaub wurde anschließend in 2 ml Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) resuspendiert und nach Überführung in 2 Reaktionsgefäße (Eppendorf) für 1 min geschüttelt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 12000 Upm) pelletiert und der Überstand zusammen mit 0.4 Volumen Chloroform in ein neues Gefäß überführt. Die Proben wurden nun für 15 sec geschüttelt und erneut nach 10 min Inkubation zentrifugiert (5 min, 12000 Upm). Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol für 15 min bei RT präzipitiert. Die RNA wurde nun pelletiert (10 min, 12000 Upm) einmal mit 70 % Ethanol ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und nach lufttrocknen in 500  $\mu\text{l}$  mit DEPC (0,1 %) behandeltem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die RNA erneut durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  LiCl-Puffer (4 M LiCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht präzipitiert. Nach Auftauen der Probe wurde die RNA durch Zentrifugation (30 min, 13000 Upm) pelletiert und anschließend 2-mal mit 70 % Ethanol ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde dann für 15 min luftgetrocknet und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  mit DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

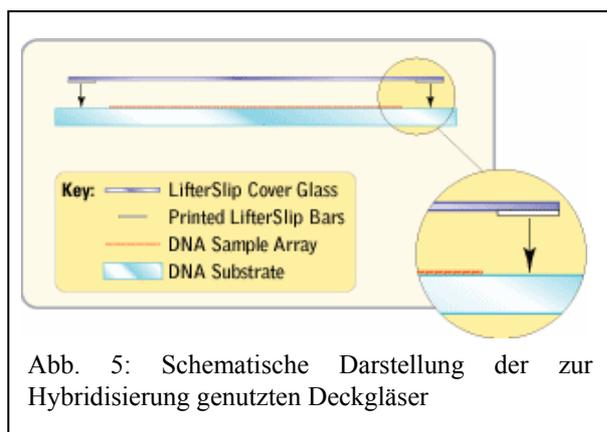
### 2.6.1.3 Synthese der Komplementär-DNA

Mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase-Reaktion und Fluorochrom-modifizierter Nukleotide (Cy3- bzw. Cy5 dCTP) wurde eine farblich markierte cDNA aus Gesamt-RNA hergestellt. Die folgenden Reaktionen wurden soweit wie möglich unter Lichtausschluss durchgeführt, da die benutzen Fluorochrome lichtempfindlich sind. Der Reaktionsansatz (Tab. 8) wurde nach fünfminütiger Denaturierung bei  $65^{\circ}\text{C}$  für 5 min auf  $42^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, mit 3  $\mu\text{l}$  Rnasin (Promega) sowie mit 3  $\mu\text{l}$  Superscript II RT (Invitrogen) versetzt und für 2 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 1 h wurden weitere 3  $\mu\text{l}$  Enzym hinzugefügt. Durch Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  EDTA (50 mM, pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt. Zur Degradation der RNA wurde der Ansatz dann mit 10  $\mu\text{l}$  NaOH-Lösung (10 M) versetzt und für 20 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Neutralisierung des Ansatzes mit 20  $\mu\text{l}$  Essigsäure (5 M) wurde die cDNA mit Hilfe des Qia-quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der cDNA von den Säulen erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll mit 2 x 50  $\mu\text{l}$  auf  $42^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem Wasser. Nach Vereinigung der zwei Eluate wurden diese mit Hilfe von Microcon-YM30 Säulen (Millipore) auf ein Volumen von 10  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert.

Tab. 8: Reaktionsansatz zur Herstellung von markierter cDNA aus Gesamt-RNA

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
5x Erststrang Puffer	24
<i>C. albicans</i> specific primer mix (0,1 pmol/ $\mu\text{l}$ )	3
AncT mRNA primer (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	3
Oligo dT18-21 (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	6
10 mM dNTP-dCTP	18
1 mM dCTP	3
1 mM Cy3- oder Cy5 dCTP	4,5
0,1 M DTT	12
RNAsin	3
Gesamt RNA	x $\mu\text{l}$ (30 $\mu\text{g}$ ) ad H <sub>2</sub> O 120 $\mu\text{l}$

#### 2.6.1.4 Hybridisierung und Waschen der DNA-Microarrays



Es wurden Mikroarrays der Fa. Eurogentec, Belgien genutzt, welche die DNA von 6039 offenen Leserastern des *C. albicans* Stammes SC5314 tragen. Jedes PCR-Produkt ist hierbei zweimal auf einem Glasobjektträger platziert. Zur Hybridisierung wurden die Objektträger mit einem Deckglas mit seitlichen Rändern (Erie Scientific Componay, USA Abb. 5) bedeckt. Je 10  $\mu\text{l}$  der zu vergleichenden markierten cDNA (Cy3 und Cy5) wurden zusammen mit 10  $\mu\text{l}$  Heringsperma-DNA (10 mg/ml) für 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Die Probe wurde nun mit 60  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer (Roche) versetzt und dann seitlich unter den Rand des Deckglases pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Hybridisierungslösung unter das Deckglas gezogen. Der Objektträger wurde dann in eine Hybridisierungskammer (Corning) gelegt und am Rand mit 2 mal 10  $\mu\text{l}$  Wasser versehen. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad für 24 h bei 42°C. Die Objektträger wurden anschließend aus den Hybridisierungskammern entnommen und mit mäßiger Bewegung 2 mal für 10 min mit Waschlösung 1 (30 mM NaCl, 3 mM Citrat, 0,1 % SDS) und 2 mal für 10 min mit Waschlösung 2 (30 mM NaCl, 3 mM Citrat) gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger durch Zentrifugation (6 min, 550 Upm) getrocknet.

#### 2.6.1.5 Scannen der DNA-Microarrays

Die DNA-Microarray Objektträger wurden mit einem Scanner der Firma Fuji (FLA-8000) bei einer Auflösung von 10  $\mu\text{m}$  eingescannt. Für Cy3 markierte DNA wurde mit einer Wellenlänge

von 532 nm und für Cy5-markierte DNA bei einer Wellenlänge von 640 nm gescannt. Die Quantifizierung der Signale und des Signalhintergrunds erfolgte mit dem Programm AIDA Array Metrix (Raytest).

### 2.6.1.6 Normalisierung und statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms Genespring (Silicon Genetics) ausgewertet. Hier wurde eine Intensitätsabhängige (niedrigste) Normalisierung durchgeführt. Die normalisierten Daten wurden anschließend in das Programm Excel (Microsoft) exportiert. Da jedes Gen auf den benutzten Arrays doppelt vorhanden ist und pro Experiment mindestens drei Replikate durchgeführt wurden, ergeben sich so für jedes Gen mindestens sechs Signalintensitätsverhältnisse (Intensität Experiment dividiert durch Intensität Referenz). Als reguliert wurde nur diese Gene bezeichnet, bei denen der Mittelwert aus den sechs Einzelwerten eine mindestens 1,5-fache Änderung zeigte und welche eine durch das Programm SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>) ermittelte statistische signifikante Abweichung zeigten. Bei der statistischen Auswertung mit SAM wurde ein delta-Wert nach folgenden Kriterien ausgewählt. Wenn der minimal angezeigte FDR-Wert (false discovery rate) über 5 % lag wurde dieser entsprechende delta-Wert für die statistische Auswertung genommen. Falls der minimale FDR-Wert unter 5 % lag, wurde ein delta-Wert der einem 5 %igen FDR-Wert entspricht gewählt, außer wenn dies zu über 1000 signifikant regulierten Genen führte. In diesem Fall, wurde ein delta-Wert gewählt, der einer FDR von 1 % entspricht.

### 2.6.1.7 Clusteranalysen

Für Clusteranalysen wurden die Daten aller Replikate eines Experimentes gemittelt und dann in das Programm Genespring importiert. Die Clusteranalysen mit den jeweils angegebenen Genen wurden mit Genespring nach Standardbedingungen durchgeführt.

## 2.6.2 Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über Northern Blot-Analyse

Für die Northern Blot-Analyse wurden 30 µg Gesamt-RNA mit einem denaturierenden Formaldehydgels aufgetrennt (4 h 100 V) und anschließend mit Hilfe eines Kapillarblots (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 3 min) und anschließender Inkubation bei 80°C (2 h). Vor der Zugabe der Sonde wurde die Membran für 1 h bei 42°C mit Prähybridisierungslösung (5x SSPE; 50 % deionisiertes Formamid; 1 % Ficoll; 1 % Polyvinylpyrrolidon; 1 % BSA; 0,5 % SDS; 50 ng denaturierte Heringssperma DNA) prähybridisiert. Anschließend wurde die markierte Sonde hinzugegeben und die Membran für 16 h bei 42°C inkubiert. Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte nach dem Prinzip des „random priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983). In einem Reaktionsansatz von 20 µl kamen hierbei 20-50 ng denaturierter DNA sowie 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP zum Einsatz. Die markierte DNA wurde anschließend über Sephadex -Säulen (Mobispin S200, MoBiTec) aufgereinigt und nach Denaturierung (10 min, 95°C) zur Hybridisierung eingesetzt.

Der Hybridisierung über Nacht folgten zwei je 10 minütige Waschstreitte mit Waschlösung I (2x SSPE; 0,1 % SDS; Raumtemperatur) und Waschlösung II (1x SSPE; 0,1 % SDS; 50°C). Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie unter Verwendung von Röntgenfilmen (X-OMAT AR, Kodak) und eines Expositionsverstärkers (Biomax MS Screen, Kodak) bei -70°C. Die in der Northern-Analyse verwendeten Sonden wurden durch PCR generiert. Die genutzten Primer sind in Tab. 9 angegeben.

Tab. 9: Zur Amplifikation der Northern-Sonden genutzte Oligonukleotide

Transkript	Sonde
FBA1	FBA1, hin und FBA1, her
PFK1	PFK1, hin und PFK1, her
FUM12	FUM12, hin und FUM12, her
HHF22	HHF22, hin und HHF22, her

1x SSPE-Lösung: 180 mM NaCl; 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA; pH 7,4

### 2.6.3 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der Chromatinimmunpräzipitation ist es möglich *in vivo* die Interaktion von Proteinen mit der DNA nachzuweisen, selbst wenn die Proteine indirekt in einem Komplex die DNA binden. Das zu untersuchende, DNA-bindende Protein wird mit einem Epitop markiert und kann dadurch mittels Antikörpern, die an Protein G-Sepharose gebunden sind, präzipitiert werden. Da vor der Immunpräzipitation alle Protein-Protein und Protein-DNA Interaktionen durch Behandlung mit Formaldehyd quervernetzt wurden, kann die gebundene DNA im Präzipitat durch PCR nachgewiesen werden.

Hierzu wurden Zellen, welche das zu untersuchende Epitop-markierte Protein exprimieren in einen Volumen von 100 ml bis zu einer OD<sub>600</sub>=1,0 angezogen. Um die Proteine untereinander und mit der DNA quervernetzen, wurde der Kultur 2,8 ml Formaldehyd hinzugegeben und diese bei RT 15 min geschüttelt. Nach stoppen der Quervernetzung durch Zugabe von 5 ml Glycin [2,5 M] und 5 minütigen Schütteln bei RT wurden die Zellen geerntet (5 min bei 3.500 Upm) und anschließend 2-mal mit kaltem TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl) gewaschen. Das Zellpellet wurde über Nacht bei -70°C eingefroren. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen am nächsten Tag in 500µl Lysis-Puffer (50 mM Hepes; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % Na- Deoxycholate; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidine; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/mlPepstatin; 1 µg/ml Bestatin) resuspendiert mit einem Volumen Glasperlen (Ø 0,45 mm) versetzt und die Zellsuspension dann zweimal für 10 min auf einen Vibrax (Janke und Kunkel, VX2E) mit höchster Stufe gerüttelt. Die Unterseite des Reaktionsgefäßes wurde mit einer heißen Nadel durchstoßen und das Lysat durch eine 3 minütige Zentrifugation bei 1.500 Upm gesammelt. Das Lysat wurde dann erneut für 10 min bei 8.000 Upm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend zum Scheren des Chromatins dreimal für 12 sec sonifiziert. Zwischen den Intervallen wurden die Proben auf Eis gekühlt. Es wurden so DNA-Fragmente zwischen 500 und 1000 bp erhalten. Vor der anschließenden Immunpräzipitation (IP) wurden 50 µl der Probe als Input-DNA eingefroren. Für die IP wurden 5 µl Antikörper sowie 50 µl einer 50 %igen Protein G-Sepharose Lösung

hinzugegeben und die Suspension 4 h bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend sukzessive je 5 min gewaschen, zweimal mit Lysis-Puffer, einmal mit Wasch-Puffer I (Lysis-Puffer mit 500 mM NaCl), einmal mit Wasch-Puffer II (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,25 M LiCl; 0,5 % NP40; 0,5 % Na-Deoxycholate, 1 mM EDTA) und einmal mit TE (20 mM EDTA; pH 8,0; 1 mM EDTA). Durch Zugabe von 100 µl Elutions-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1 % SDS) und einer 15 minütigen Inkubation bei 65°C wurden die Präzipitate von dem Antikörper gelöst. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (5 sec bei 13.000 Upm) wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose erneut mit 150 µl TE / 0,67 % SDS gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und zur Aufhebung der Quervernetzungen 6 h bei 65°C inkubiert. Zur Aufreinigung der koimmunpräzipitierten DNA wurden zunächst die Proteine durch Zugabe von 250 µl TE, 5 µg Glykogen und 100 µg Proteinase K für 2 h bei 37°C verdaut und anschließend die DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt. Um die DNA von RNA zu befreien, wurden dem Ansatz 10 µg RNase hinzugegeben und dieser für 1 h bei 37°C inkubiert. Je 2 µl der DNA wurden anschließend in einer Multiplex-PCR analysiert werden.

## **2.6.4 Analyse von Proteinen**

### **2.6.4.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten**

Zur Herstellung von Rohextrakten wurden 20 ml Medium aus einer Übernachtskultur auf  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft und die Kultur mehrere Stunden bei 30°C inkubiert. Diese Kultur wurde dann bei einer  $OD_{600}$  zwischen 1 und 4 abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm), das Pellet in 2 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und über Nacht bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 500 µl RE-Puffer (50 mM HEPES-KOH; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton X-100, pH 7,5) aufgenommen und mit einem Volumen Glasperlen versetzt. Nach 10 min Schütteln auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kunkel) auf höchster Stufe bei 4°C erfolgte eine Abtrennung der Zelltrümmer und der Glasperlen von dem klaren Überstand durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Rohextrakte bei -70°C gelagert.

### **2.6.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von 465 nm auf 595 nm des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 bei der Bindung an Proteine. Die Bestimmung erfolgte in einem Beckmann-Photometer (DU 7400) bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Assay der Firma BioRad. Als Standard diente eine BSA-Eichkurve.

### **2.6.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Hierzu wurden denaturierende SDS-Gele verwendet, deren Polyacrylamidkonzentration zwischen 8 und 12 % variierte. Zunächst wurde das untere Trenngel (0,375 M Tris pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 8-12 % Acrylamid) gegossen, welches sofort

nach dem Gießen mit Wasser gesättigtem Butanol überschichtet wurde. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1 h) wurde der Butanol mit Wasser herausgespült und das Sammelgel (0,125 M Tris pH 6,7; 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 5 % Acrylamid) über das Trenngel gegossen. Zum Gießen der Gele wurde eine Apparatur von Hoefer Scientific (San Francisco, USA) verwendet.

#### Vorbereitung der Proben:

Die aufzutrennenden Proteine wurden sofort nach der Präparation im Verhältnis 2:1 mit 3x Laemmli-Puffer (30 % Glycerin, 6 % SDS, 188 mM Tris/HCl pH 6,8, 15 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau; Laemmli, 1970) vermischt und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proteine im Gel wurden ggf. mit Coomassie [0,3 g Coomassie-Brilliantblue G250; 1,5 ml Methanol; 30 g TCA; ad 30 ml aqua bidest., filtrieren; 180 ml 50 % (w/v) TCA] angefärbt und anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Blaufärbung wieder entfärbt [15 % (v/v) Methanol; 7,6 % (w/v) Essigsäure].

#### Molekulargewichtsstandard:

Als Größenstandard für Proteine wurde der „High molecular weight marker“ (HMW, prestained) der Firma Sigma genutzt. Die Proteine haben eine molekulare Masse von 185000, 116000, 84000, 61500, 55000, 36000 und 31000 Da.

#### **2.6.4.4 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine über Western Blot-Analyse**

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Immobilon-P-Membran (PVDF-Membran von Millipore, Eschborn) erfolgte im Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde wie vom Hersteller empfohlen vorbehandelt.

Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte im Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) über Nacht bei 150 mA. Die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen wurden nach kurzem Anfeuchten in TBS (50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,5) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1 % „Blocking“-Lösung (Roche) geblockt. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h unter leichtem Schütteln mit dem ersten Antikörper inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurden die Filter zweimal mit TBST-Puffer [0,1 % (w/w) Tween 20 in TBS] und zweimal mit 0,5 % „Blocking“-Lösung bei RT jeweils 10 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation (1 h) mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper in 1 % „Blocking“-Lösung.

Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 4-mal mit TBST-Puffer für 15 min gewaschen. Nach kurzem Waschen in PBS (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) erfolgte die Detektion durch die Verwendung des Chemilumineszenzsubstrates „Super-SignalULTRA“ (Pierce) entsprechend der Anweisung des Herstellers und Röntgenfilmen (Fuji).

Tab. 10: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle	Verdünnung	Bezug
Anti-FLAG	Monoklonal	Maus	1:1000	Stratagene
Anti-HA-„High-Affinity“	Monoklonal	Ratte	1:1000	Roche

Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle	Verdünnung	Bezug
Anti-Maus	Monoklonal, Peroxidase gekoppelt	Ziege	1:20000	Dianova
Anti-Ratte	Polyklonal, Peroxidase gekoppelt	Schaf	1:1000	Roche

#### 2.6.4.5 Immunpräzipitation

Der Zellaufschluss erfolgt zunächst wie in 2.6.4.1 beschrieben. Zu 200 µl denaturierter Probe wurden 800 µl IP-Dilutionspuffer (1,25 % Triton X-100; 6 mM EDTA; 60 mM Tris/HCl; pH 7,6) gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wurde unlösliches Zellmaterial abgetrennt und der Überstand in 1,5 ml „Safe-Lock“ Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Inkubation mit 5 µl Anti-Flag-Antikörper (Stratagene) bei 4°C, über Nacht und leichtem Invertieren wurden die Proben mit 50 µl 20 %iger Protein-A-Sepharose-Lösung (20 % Protein-A-Sepharose in IP-Puffer, siehe unten) versetzt und weitere 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit IP-Puffer (1 % Triton X-100; 0,2 % SDS; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Sepharose-Pellet wurde mit 50 µl IP-Puffer, 50 µl 2x Laemmli-Puffer (siehe 2.6.4.3) und 100 mM DTT versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Zur Auftrennung wurden 20 µl auf ein 8 %iges SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.6.4.3).

#### 2.6.5 Koimmunpräzipitation

Wie in 2.6.4.1 beschrieben, wurden Rohextrakte aus Transformanten des Stammes CAI8 der zwei Epitop markierte Proteine produziert, gewonnen. Die Herstellung der Rohextrakte erfolgte allerdings mit einem abgewandelten RE-CO-Puffer (20 mM TrisHCl, pH 7,2; 12,5 mM KAc; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM Na-Bisulfit; 0,5 mM EDTA; 10 % Glycerol; 1 % Tween20). Durch Zugabe von 40 µl Protein-A-Sepharose zu 200 µl Rohextrakt und anschließender Inkubation bei 4°C unter Bewegung für eine Stunde wurden unspezifisch an Protein-A bindende Bestandteile des Rohextraktes durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand zu 40 µl neuer Protein-A-Sepharose gegeben. Nach einer Stunde wurden 5 µl Antikörper zugegeben und weitere drei Stunden unter Bewegung bei 4°C inkubiert, anschließend dreimal mit RE-CO-Puffer gewaschen und schließlich in 50 µl SDS-Auftragspuffer mit 5 µl 1M DTT für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Durch Detektion mit dem Antikörper gegen das zweite Protein kann nach einer SDS-PAGE und

einer Western Blot-Analyse eine Bindung des zweiten Proteins and das erste Protein nachgewiesen werden.

### 2.6.5.1 Zwei-Hybrid-Analyse

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

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die Hybridproteine in den Stamm pJ69-4a transformiert und je drei unabhängige Transformanten auf synthetischen Minimalmedien, denen ein Aminosäuremix ohne den entsprechenden Auxotrophiemarker zugesetzt wurde, ausplattiert. Alternativ wurde eine Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durchgeführt.

### 2.6.5.2 Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität („Overlay-Assay“)

Zur groben und schnellen Abschätzung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde der „Overlay-Assay“ verwendet (Suckow und Hollenberg, 1998). Dazu wurden Zellen auf Platten ausgestrichen oder getropft und über Nacht inkubiert. 1 % Agarose wurde mit 10 ml H<sub>2</sub>O aufgeköcht und danach mit 10 ml 1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,0, versetzt. Nach Abkühlen wurden diesem Gemisch 50  $\mu$ l SDS-Lösung (10 %) und 400  $\mu$ l X-Gal-Lösung (5 mg/ml in DMF gelöst) zugesetzt. Jede Platte wurde mit 10 ml dieser Lösung überschichtet und nach dem Erkalten für 2 - 8h bei 30°C inkubiert. Anschließend konnte eine Blaufärbung beobachtet werden, die fotografisch dokumentiert wurde.

### 2.6.5.3 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Die genaue Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Zellen, die in der Zwei-Hybrid-Analyse verwendet wurden, erfolgte mittels einer Endpunktbestimmung. Die OD<sub>600</sub> einer Übernachtskultur wurde gemessen und 1 ml dieser Kultur abzentrifugiert (2 min, 13000 Upm). Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l Lysis-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) aufgenommen und bei -70°C mindestens zwei Stunden gelagert. Die Proben wurden bei 30°C aufgetaut und mit 750  $\mu$ l Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mg/ml O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, pH 7,0) bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt und die Inkubationszeit (t) ermittelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Extinktion bei 420 nm photometrisch bestimmt, wobei die Extinktion 1,0 nicht überschreiten

sollte. Die Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel ermittelt (Golemis und Khaha, 1994; Miller, 1972):

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

Für den Test wurden jeweils doppelte Übernachtskulturen angesetzt, von denen wiederum Doppelproben untersucht wurden. Es wurden bei jedem Testansatz Positivkontrollen sowie Negativkontrollen eingesetzt.

#### **2.6.5.4 Bestimmung der Luziferase Aktivität**

Die Luziferase-Aktivität wurde unter Verwendung des Dual-Luziferase Assay System der Firma Promega in einem Luminometer der Marke Fluoroskan Ascent FI der Firma Labsystems bestimmt. In weißen 96er Platten der Firma Labsystems (cliniplate) wurden 100 µl LARII-Reagenz vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Rohextrakt gestartet. Über einen Zeitraum von 10 Sekunden wurde unmittelbar nach Zugabe des Rohextraktes die Hintergrundaktivität bestimmt, welche jedoch unter der Nachweisgrenze lag. Nach Zugabe von 100 µl Stop&Glo-Reagenz wurde über 10 Sekunden die Aktivität der Luziferase bestimmt. Die Enzymaktivität wurde nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.6.4.2) auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

## **2.7 Transformation**

### **2.7.1 Transformation von *E. coli***

Zur Amplifikation klonierter Gene ist es notwendig, diese in einen geeigneten Organismus zu transformieren. Das Bakterium *E. coli* eignet sich aufgrund der hohen Transformationseffizienz, der geringen Verdoppelungszeit und der hohen DNA-Ausbeute besonders für diesen Zweck. Der Erfolg der Transformation ist abhängig von der DNA (Struktur), der Art der Transformationsmethode und dem Kompetenzgrad der als Empfänger eingesetzten Bakterien. Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983).

### **2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae***

Die Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* wurde in Anlehnung an die Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991), durchgeführt.

### 2.7.3 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans*-Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Sherman *et al.* (1986) in der von Srikantha *et al.* (1995) modifizierte Form. Zur Integration von DNA-Fragmenten wurden hier 5 µg DNA in die sphäroplastierte Zellen transformiert. Für die Transformation von Plasmiden wurde eine Li-Acetat-Methode verwendet. Hierbei wurden 200 µl einer über Nacht Kultur abzentrifugiert und in 100 µl 10 x OSB-Mix (0,2 ml 1 M LiAc; 0,8 ml 50 % PEG 8000; 15 mg DTT; 250 µg ssDNA) aufgenommen. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wurden die Zellen gemischt und 60 min bei 43,5°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C drei Tage inkubiert.

## 2.8 Calcofluor White-Färbung

Zur Zellwand- und Septenfärbung von Hefen wurde der Farbstoff Calcofluor White, der in das Chitin der Zellwand interkaliert (Pringle, 1991) genutzt. Hierzu wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 2 µg/ml den Zellen hinzugegeben und die Zellen nach 5 minütiger Inkubation im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge 365 nm betrachtet.

## 2.9 Konstruktion einer *EFG1-GFP-Fusion*

Zur Bestimmung der Efg1p-Lokalisation wurde eine genomische Fusion von *EFG1* an die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins hergestellt werden. Hierzu wurde eine von Gerami-Nejad *et al.* (2001) publizierte PCR-Methode eingesetzt. Mit einer PCR und Primern (*EFG1-GFP-F1*; *EFG1-GFP-R1-2*), die neben der Sequenz zur Amplifikation eines *GFP-URA3*-Fragmentes (Template: pGFP-URA), eine etwa 50 bp lange homologe Sequenz zum 3'-Bereich des *EFG1*-Gens bzw. zur 3'-untranslatierten Region trugen wurde ein PCR-Fragment generiert (siehe Schema in Abb. 6). Durch Transformation des PCR-Produktes kann dieses per homologer Rekombination in den *EFG1*-Locus integrieren, so dass eine genomische *EFG1-GFP*-Fusion unter der Kontrolle des eigenen Promotors entsteht. Die Integration des Fragmentes wurde durch eine PCR auf genomischer DNA verifiziert (Daten nicht gezeigt)

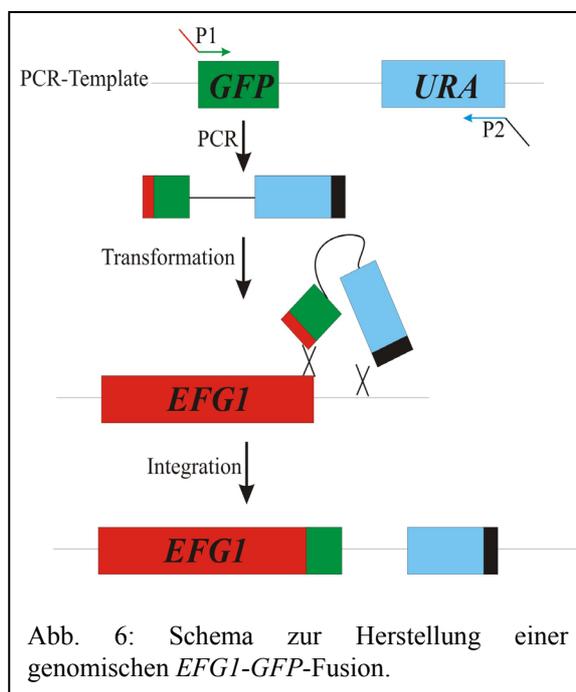


Abb. 6: Schema zur Herstellung einer genomischen *EFG1-GFP*-Fusion.

## 2.10 Mikroskopische Untersuchungen

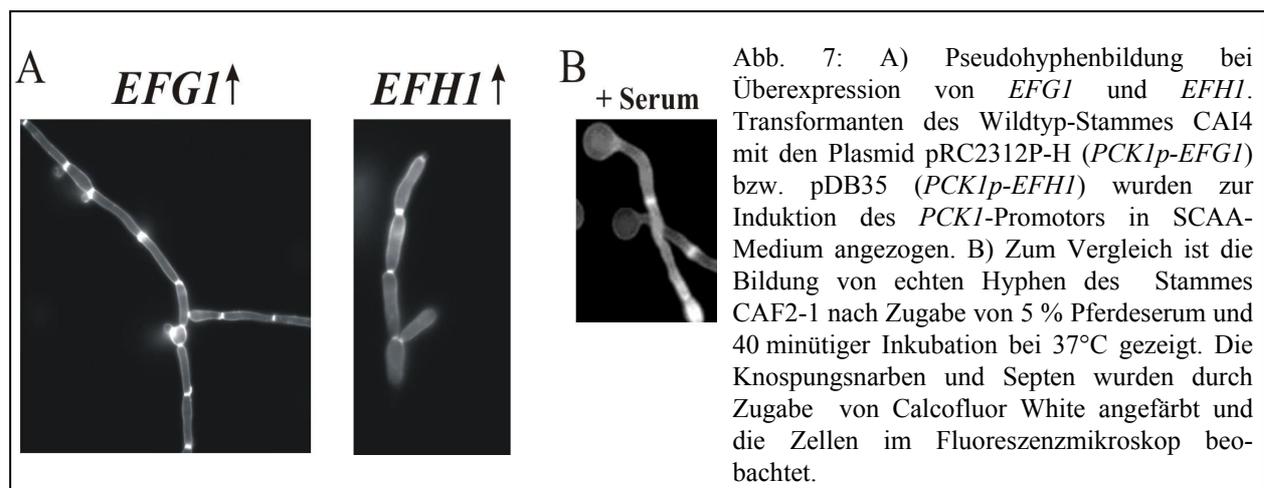
Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit dem Programm „Corel Photopaint 9.0“ nachbearbeitet.

### 3 Ergebnisse

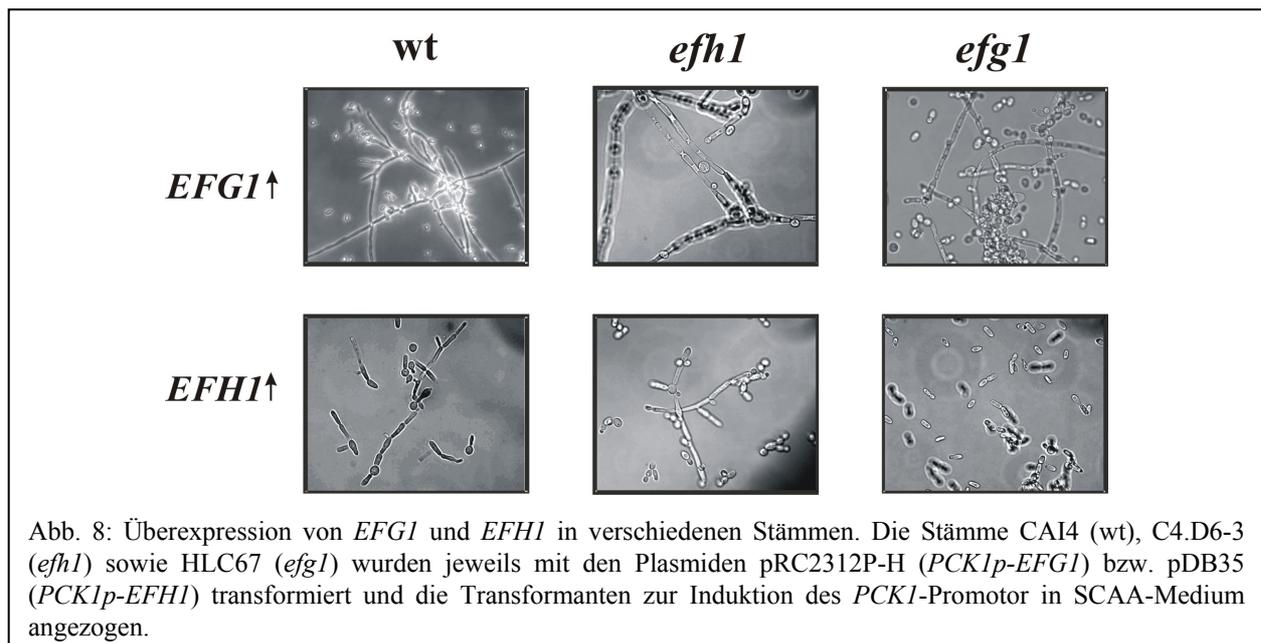
#### 3.1 Überexpression von *EFG1* und *EFH1*

Die Überexpression von *EFG1* und auch *EFH1* führt zur Ausbildung von filamentösen Zellen und deutet somit auf die Beteiligung beider Proteine an der Regulation des dimorphen Wachstums von *C. albicans* (Stoldt *et al.*, 1997; Bockmühl, 2001). Die kugelige Blastospore unterscheidet sich deutlich von den filamentösen Zelltypen. Echte Hyphen und Pseudohyphen unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Entstehung. Die durch unipolare Knospung entstehenden Pseudohyphen sind elongierte Zellen, die jeweils den Kontakt zur Mutterzelle erhalten und dadurch Zellketten bilden. Echte Hyphen hingegen entstehen durch kontinuierliches apikales Wachstum und werden durch Bildung von Septen in Kompartimente eingeteilt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den durch *EFG1*- und *EFH1*-Überexpression ausgelösten Filamenten um Pseudohyphen oder echte Hyphen handelt, wurden die Zellen mit dem Farbstoff Calcofluor White angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in die Zellwand und färbt hierbei besonders chitinhaltige Knospungsnarben und Septen an. Zur Überexpression der Gene wurden Fusionen der Gene an den regulierbaren *PCK1*-Promotor genutzt, der in Abwesenheit von Glukose stark induziert wird. Wie in Abb. 7A anhand der gefärbten Zellwände zwischen Blastospore und elongierten Tochterzellen zu erkennen ist, handelt es sich sowohl bei *EFG1*, als auch bei *EFH1*-Überexpression um Pseudohyphen. Echte Hyphen hingegen werden unter Induktionsbedingungen (Serum, 37°C) aus Hefezellen gebildet, die erst sekundär durch Bildung von Septen unterteilt werden. Zwischen der Blastospore und dem Keimsschlauch ist in diesem Fall keine Zellwand zu erkennen (Abb. 7B). Ein weiteres Merkmal von echten Hyphen ist der im Vergleich zur Mutterzelle geringere und konstante Durchmesser des Keimsschlauches (Abb. 7B; Sudbery, 2001). Pseudohyphen, die durch *EFG1*- und *EFH1*-Überexpression ausgelöst werden, besitzen Filamente mit etwa dem gleichen Durchmesser wie die Mutterzelle.

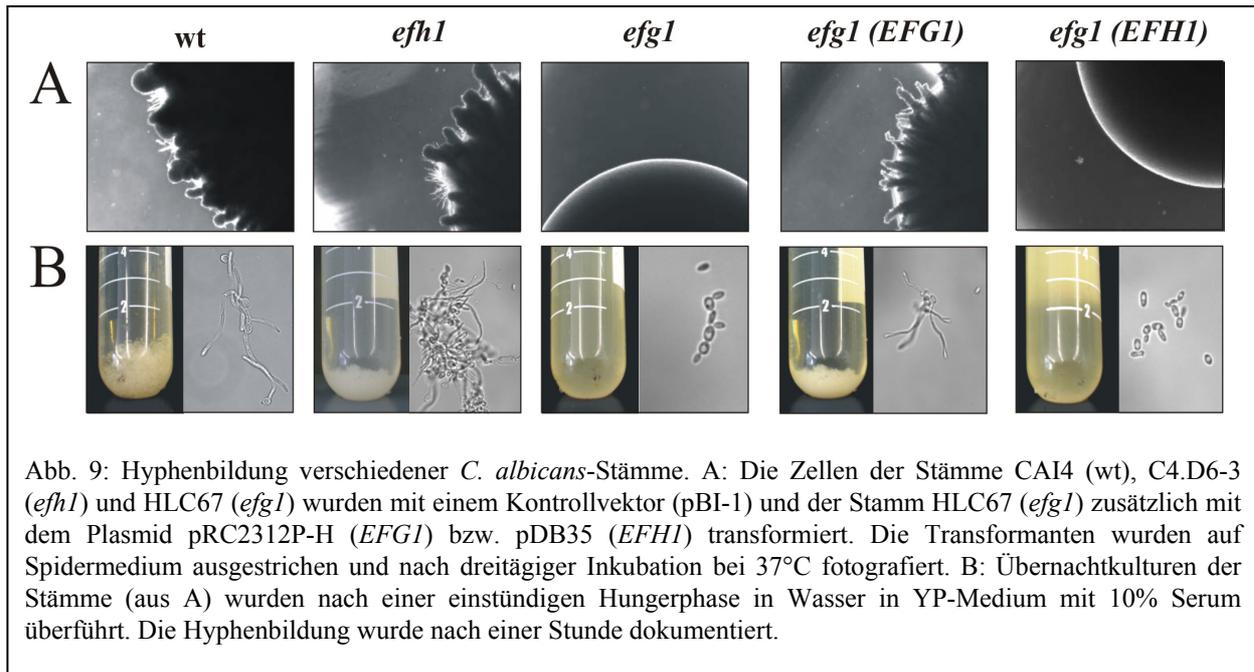


Um zu überprüfen, ob die Pseudohyphenbildung bei der *EFG1* bzw. *EFH1*-Überexpression jeweils vom Vorhandensein des anderen Proteins abhängig ist, wurde die Überexpression der Gene in beiden Mutanten verglichen. Hierzu wurden die Plasmide pRC2312P-H sowie pDB35 in die Stämme CAI4 (wt), HLC67 (*efg1*) und C4.D6-3 (*efh1*) transformiert. Wie in Abb. 8 zu sehen ist, führt die Überexpression von *EFG1* im Wildtyp und in beiden Mutanten zu filamentösem Wachstum. Bei Überexpression von *EFH1* können lediglich beim Wildtyp sowie bei der *efh1*-Mutante filamentöse Zellen beobachtet werden. Die Zellen der *efg1*-Mutante zeigen Pseudohyphen nur bei *EFG1*-, aber nicht bei *EFH1*-Überexpression. Hieraus wird deutlich, dass für die durch *EFH1*-Überexpression vermittelte Pseudohyphenbildung Efg1p nötig ist. Die durch *EFG1*-Überexpression ausgelöste Pseudohyphenbildung ist hingegen unabhängig von Efh1p.

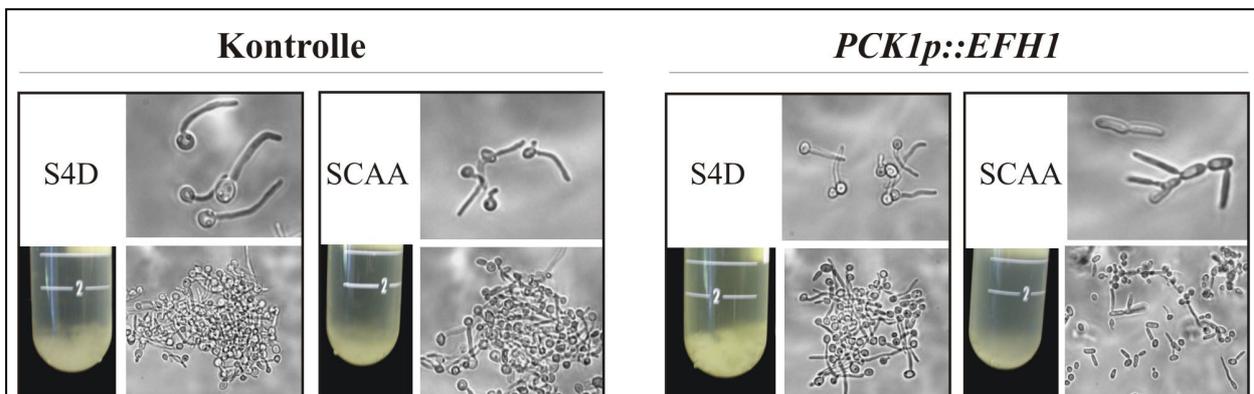


### 3.2 Einfluss der Deletion und der Überexpression von *EFH1* auf die Hyphenbildung

Da sowohl die Deletion, als auch die Überexpression von *EFG1* die Ausbildung von echten Hyphen unterdrückt (Lo *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003), sollte ebenfalls der Einfluss der Disruption und Überexpression von *EFH1* auf die Hyphenbildung untersucht werden. Die Deletionsstämme wurden dazu sowohl auf festen, als auch in flüssigen Induktionsmedien angezogen (siehe 2.2.5 und 2.2.6). Wie in Abb. 9 gezeigt, ist die *efh1*-Mutante in beiden Induktionsmedien in der Lage, so wie der Wildtyp echte Hyphen zu bilden. Auch die mit der Hyphenbildung einhergehende Aggregatbildung der Zellen ist wie im Wildtyp zu beobachten. Da die Überproduktion beider Proteine filamentöses Wachstum induziert, wurde ebenfalls überprüft, ob Efh1p den Hyphendefekt des *efg1*-Stammes komplementieren kann. In der Abb. 9 wird deutlich, dass dieses nicht der Fall ist. Während die Expression von *EFG1* den Hyphendefekt komplementiert, kann durch Überexpression von *EFH1* der Phänotyp der *efg1*-Mutante nicht komplementiert werden.



Es ist bekannt, dass der Transkriptpegel von *EFG1* während der Hyphenbildung von *C. albicans* stark reguliert ist (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Innerhalb weniger Minuten nach Induktion wird die Transkriptmenge, vermutlich durch Autoregulation von *EFG1*, stark vermindert. Erst nach etwa einer Stunde, wenn alle Zellen Keimschläuche ausgebildet haben und anfangen lateral zu knospen, steigt die Menge an *EFG1*-Transkript wieder auf das ursprüngliche Niveau an. Die Überexpression von *EFG1* vor oder während der Hypheninduktion inhibiert die Ausbildung von echten Hyphen (Tebarth *et al.*, 2003). Um zu überprüfen ob die *EFH1*-Überexpression ebenfalls die Hypheninduktion beeinflusst, wurde eine *PCK1p-EFH1*-Fusion genutzt, bei der die Expression von *EFH1* durch Induktion oder Repression des *PCK1*-Promotors gesteuert werden kann. Der *PCK1*-Promotor ist in glukosehaltigen Medien (S4D) reprimiert und in glukosefreien Medien (SCAA) aktiviert. Wie in Abb. 10 zu erkennen, bildet der Stamm mit der *PCK1p-EFH1*-Fusion unter reprimierenden Bedingungen für den *PCK1*-Promotor Hyphen und zeigt die typische Aggregation der Zellen. Bei Induktion der *EFH1*-Expression in SCAA-



Medium sind dagegen keine echten Hyphen vorhanden und die Aggregatbildung fehlt, während Pseudohyphen zu beobachten sind. Der einen Leervektor tragende Kontrollstamm zeigt wie zu erwarten auch in SCAA-Medium die Bildung von echten Hyphen und die Aggregatbildung.

### 3.3 Lokalisation von Efg1p

Entscheidend für die Funktion sowie die Regulation eines Proteins ist dessen zelluläre Lokalisation. Bockmühl konnte 2000 zeigen, dass eine Fusion von Efg1p an das grün fluoreszierende Protein (GFP) bei Überexpression im Zellkern lokalisiert. Vielfach wird die Funktion eines Transkriptionsfaktors dadurch reguliert, dass er sich in inaktiven Zustand im Zytoplasma befindet und somit nicht an die DNA binden kann. Die Kernlokalisierung kann einerseits durch eine Verhinderung des Kernimports oder durch einen verstärkten Export reguliert werden. Diese Möglichkeit der Regulation sollte für Efg1p während der Hypheninduktion untersucht werden. Hierzu konnte die von Bockmühl genutzte Fusion nicht genutzt werden, da diese unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors stand, die zur Ausbildung von Pseudohyphen führte. Pseudohyphen inhibieren aber die Bildung echter Hyphen (siehe 3.2).

Zur Bestimmung der Efg1p-Lokalisation wurde daher eine genomische Fusion von *EFG1* an *GFP* konstruiert (siehe 2.9). Der entstandene Stamm C4TD1 wurde daraufhin zur Ausbildung der Hefeform in Vollmedium (YPD, 30°C), sowie zur Induktion der Hyphenbildung in YP-Medium mit 5 % Pferdeserum (37°C) angezogen. Nach Anfärbung der DNA mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) wurden die Zellen bei verschiedenen Wellenlängen beobachtet. Im Durchlicht ist zu erkennen, dass die Zellen bei Wachstum in YPD (30°C) als Hefen und bei Anzucht in YP 5% Serum (37°C) als Hyphen wachsen (Abb. 11). Bei dem Vergleich der Aufnahmen wird deutlich, dass das Efg1-GFP-Fusionsprotein sowohl in der

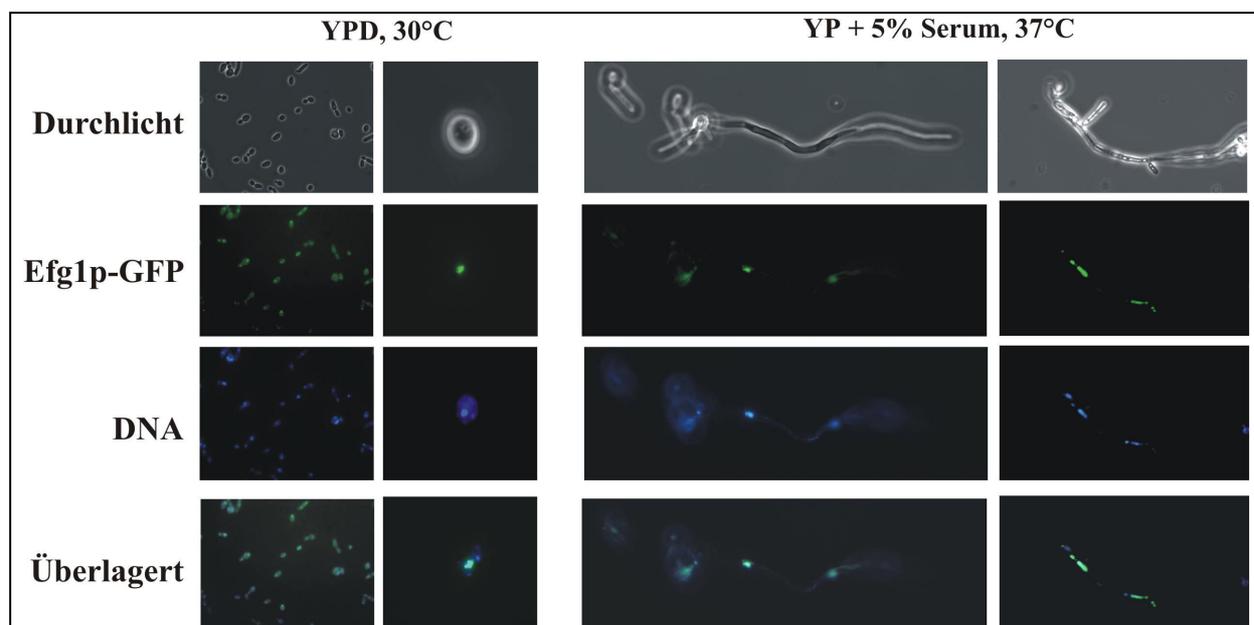


Abb. 11: Lokalisierung von Efg1p. Der Stamm C4-TD1 wurde über Nacht in YPD-Medium angezogen. Zur Induktion von Hyphen wurden die Zellen eine Stunde in YP-Medium mit 5% Serum überführt und bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop unter Zugabe von 5 µl DAPI (2 mg/ml) bei verschiedenen Wellenlängen beobachtet. (Efg1-GFP: 495 nm, DAPI: 365 nm)

Hefeform, als auch in der Hyphenform mit der DNA des Zellkerns kolokalisiert. In der Hyphenform sind die Signale für die DNA und für Efg1-GFP in jedem Zellkompartiment, die durch Septen voneinander getrennt sind, zu erkennen. Efg1p befindet sich somit unter beiden Bedingungen im Zellkern.

### 3.4 Nachweis von Efh1p und Efg1p im Immunoblot

In Immunoblot-Analysen konnte Efg1p bei Expression in *C. albicans* oder *S. cerevisiae* trotz der errechneten Größe von etwa 62 kDa als Dreifachbande bei einer Laufhöhe von 86-90 kDa detektiert werden (Sonneborn, 1999). Bei heterologer Expression in *E. coli* wurde hingegen ein Signal bei der errechneten Größe detektiert (Doedt, 2000). Das modifizierte Laufverhalten ist somit vermutlich auf Eukaryonten-spezifische posttranslationale Modifizierungen zurückzuführen. In Immunoblot-Analysen konnte eine Phosphorylierung von Efg1p gezeigt werden (Bockmühl, 2001). Das modifizierte Laufverhalten von Efg1p konnte jedoch nicht auf diese Phosphorylierung zurückgeführt werden. Eine mögliche Glykosylierung von Efg1p wurde bereits von Sonneborn (1999) untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch Efh1p ein verändertes Laufverhalten zeigt. Durch Koexpression von Epitop-markierten Efg1p und Efh1p und einer Quervernetzung durch Glutaraldehyd sollte eine mögliche Homo- oder Heterodimerisierung der beiden bHLH-Proteine überprüft werden. Um das Efh1p-Protein im Immunoblot zu detektieren, wurde ein Expressionvektor konstruiert, welcher unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors eine Fusion von Efh1p an das Hämagglutinin-Epitop (HA) des Influenza-Virus exprimiert (pTD13). Zellen, die die *HA-EFHI* Genfusion überexprimieren, zeigen im gleichen Maße Pseudohyphenbildung wie Zellen, die unmarkiertes *EFHI* exprimieren (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass das Fusionsprotein funktionell ist. Neben der alleinigen Expression von *HA-EFG1* oder *HA-EFHI* wurden beide Genfusionen im Stamm CAI8 auch gleichzeitig exprimiert.

Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, konnte das HA-Efg1-Fusionsprotein wie bereits von Sonneborn

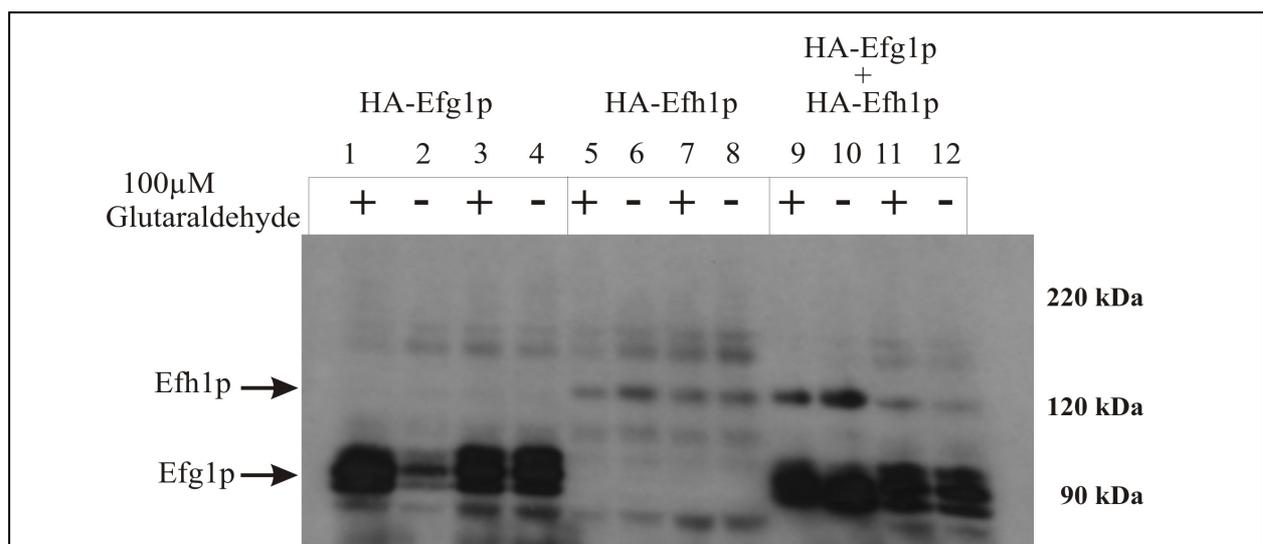


Abb. 12: Nachweis von HA-Efg1p und HA-Efh1p im Immunoblot. Spur1-4: CAI8 Transformanten mit pAPEA (*PCK1p-HA-EFG1*) und pBI-1 (*PCK1p*). Spur5-8 CAI8 Transformanten mit pTD13 (*PCK1p-HA-EFHI*) und pBT4. Spur 9-12: CAI8 Transformanten mit pTD13 und pAPEA. Die Rohextrakte der Spuren 1,3,5,7,9 und 11 enthielten 100 µM Glutaraldehyd. Je 40 µl Zellextrakt von in SCAA-Medium angezogenen Zellen wurden in einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die Fusionsproteine mit einem Anti-HA-Antikörper nachgewiesen.

gezeigt im Immunoblot als Dreifachbande detektiert werden (Spuren 1-4 und 9-12). Das HA-Efh1-Fusionsprotein konnte bei einer Größe von etwa 120 kDa detektiert werden (Spuren 5-12). Wie bei Efg1p ist auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen tatsächlichem und errechnetem Molekulargewicht zu beobachten. Das errechnete Molekulargewicht von Efh1p liegt mit etwa 82 kDa wie auch bei Efg1p um ungefähr 30 kDa unter der detektierten Laufhöhe. Sowohl bei der alleinigen Expression als auch bei der Koexpression beider Proteine (Spur 9-12) ist nach Zugabe von 100  $\mu$ M Glutaraldehyd kein Unterschied im Laufverhalten der Proteine zu erkennen.

Da auch das Laufverhalten von Efh1p nicht der errechneten Größe entspricht, wurden im Rahmen dieser Arbeit einige mögliche Proteinmodifizierungen von Efg1p und Efh1p untersucht. Neben der Glykosylierung und Phosphorylierung werden Proteine oftmals auch durch das Anhängen von kurzen Polypeptiden modifiziert. Diese Modifizierungen haben regulatorische Funktionen. So führt die kovalente Bindung eines Ubiquitin-Polypeptids an ein Protein zu einem verstärkten Abbau des Proteins (Hershko und Ciechanover, 1998). Aber auch die Ubiquitin ähnlichen Polypeptide Smt3p (SUMO-1) und Agp12p werden kovalent an Proteine gebunden und regulieren deren Funktion (Jentsch und Ulrich, 1998). In Zwei-Hybrid-Analysen konnte eine Interaktion zwischen Smt3p und dem APSES-Protein Phd1p gezeigt werden (Ito *et al.*, 2001). Um eine mögliche Modifizierung von Efg1p und Efh1p durch Ubiquitin, Agp12p oder Smt3p zu überprüfen, wurden die Epitop markierten Proteine in *S. cerevisiae*-Stämmen exprimiert, welche Defekte in der jeweiligen Modifizierung zeigen. Dies ist möglich, da Efg1p und Efh1p in *S. cerevisiae* die gleichen Laufverhalten zeigen wie in *C. albicans*. In allen Fällen zeigten Efg1p und Efh1p in einer SDS-PAGE kein verändertes Laufverhalten, so dass eine Modifizierung durch diese Proteine ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls wurde der Einfluss der Proteinphosphatasen Sit4p und Ptc7p (Jiang *et al.*, 2001) aus *C. albicans* untersucht. Hierzu wurden die beiden Phosphatasen gleichzeitig mit Efg1p bzw. Efh1p im *C. albicans* Stamm CAI8 überproduziert. Auch hier konnte kein verändertes Laufverhalten von Efg1p und Efh1p beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

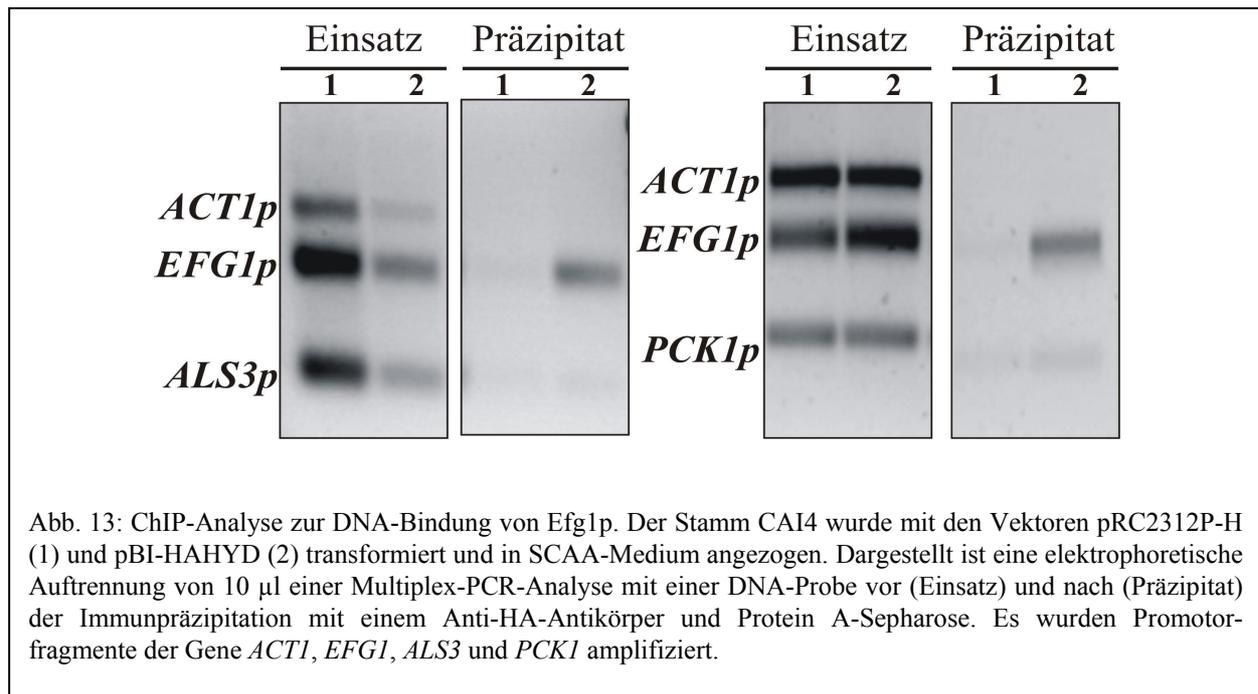
### 3.5 Autoregulation von *EFG1*

#### 3.5.1 DNA-Bindung von Efg1p

Das Expressionsniveau von *EFG1* ist von entscheidender Bedeutung für die verschiedenen Wachstumsformen von *C. albicans*. So führt eine fehlende Expression von *EFG1* zum Verlust der Fähigkeit zur Hyphen- und Chlamydosporenbildung. Des Weiteren zeigen *efg1*-Mutanten eine leicht elongierte stäbchenförmige Zellform und somit einen Defekt in der Ausbildung der Hefeform. Die Überexpression von *EFG1* führt zur Bildung von stark elongierten Pseudohyphen, inhibiert allerdings auch die Bildung von echten Hyphen. In Anbetracht dieser vielfältigen Einflüsse von Efg1p auf die Wachstumsform von *C. albicans* muss die Zelle in der Lage sein, das Expressionsniveau von *EFG1* zu regulieren. Durch Reporterstudien und Northernanalysen konnte gezeigt werden, dass der *EFG1*-Promotor in Abhängigkeit von der Efg1-Protein-Menge autoreguliert wird (Tebarth, 2001; Doedt, 2000). Ziel dieser Arbeit war es, den molekularen Mechanismus dieser Autoregulation zu überprüfen. Mit Hilfe der Chromatin-immunpräzipitation sollte eine mögliche DNA-Bindung von Efg1p an den eigenen Promotor

gezeigt werden. Hierzu wurde eine mit dem HA-Epitop markierte Efg1p-Version (pBI-HAHYD) in einem Wildtyp-Stamm (CAI4) exprimiert und Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen durch Quervernetzung mit Formaldehyd fixiert. Nach einer Immunpräzipitation mit einem Anti-HA-Antikörper wurde die koimmunpräzipitierte DNA mittels einer Multiplex-PCR analysiert.

Um zu zeigen, dass vor der Immunpräzipitation alle DNA-Fragmente im gleichen Verhältnis vorhanden sind, wurde gleichzeitig auch eine PCR auf die eingesetzte DNA vor der Immunpräzipitation durchgeführt. Wie in Abb. 13 ersichtlich ist nach der Immunpräzipitation eine deutliche Anreicherung von *EFG1*-Promotorfragmenten im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzen (*ACT1p*, *PCK1p*, *ALS3p*) zu erkennen. In Kontrollexperimenten (Abb. 13, Spur 1), bei denen eine ummarkierte Version von Efg1p (pRC2312P-H) exprimiert wurde, konnte diese Anreicherung nicht beobachtet werden. Das Experiment zeigt, dass Efg1p an den eigenen Promotor bindet. Die durch PCR amplifizierte *EFG1*-Promotorregion ist unmittelbar am Startpunkt des größeren *EFG1*-Transkriptes lokalisiert, welche sich auch in Reporterstudien als essentiell für die Autoregulation des *EFG1*-Gens darstellte (Tebarth, 2001). Eine weitere Einengung des bindenden Bereichs von Efg1p war aufgrund der Größe der präzipitierten DNA-Fragmente (500 - 1000 bp) mit dieser Methode nicht möglich.



### 3.5.2 DNA-Bindung von Sin3p

Während der Hyphenbildung wird der *EFG1*-Transkriptspiegel innerhalb weniger Minuten drastisch abgesenkt, und erreicht erst nach etwa zwei bis vier Stunden wieder das ursprüngliche Niveau. Ein aus der Bäckerhefe und vielen anderen Eukaryonten bekannter Mechanismus der Repression ist die Deacetylierung von Histonen. Während durch Acetylierung der Histone die

perlschnurartige Aufwicklung der DNA um die Histone „aufgelockert“ wird und somit die DNA zugänglich für die Proteine der Transkriptionsmaschinerie wird, wird diese Struktur bei Deacetylierung wieder verfestigt (Kurdistani und Grunstein, 2003).

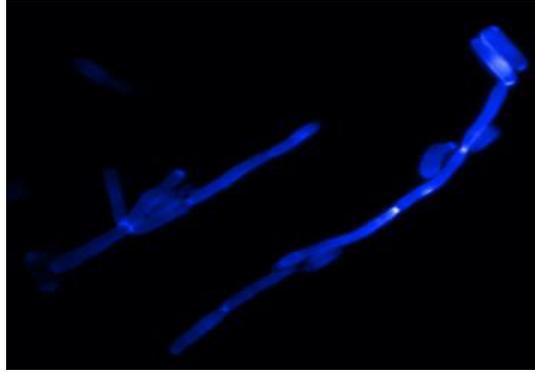


Abb. 14: Pseudohyphenbildung der *sin3*-Mutante. Zellen des Stammes SCF4 wurden in YPD-Medium angezogen, mit Calcofluor-White angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

In parallelen Studien konnte gezeigt werden, dass bei einer Mutante der Sin3-Histondeacetylase sowohl die Repression des *EFG1*-Transkriptes während der Hyphenbildung, als auch die Autoregulation von *EFG1* ausblieb (Monterola, pers. Mitteilung; Tebarth, 2001). Des Weiteren zeigen Zellen der *sin3*-Mutante eine Pseudohyphenbildung, ähnlich wie sie bei einer unregulierten, hohen *EFG1*-Expression auftritt (Abb. 14). Nach Serumzugabe bilden die Zellen keine echten Hyphen, sondern zeigen lediglich eine verstärkte Pseudohyphenbildung. Aufgrund dieser Tatsachen sollte die Hypothese überprüft werden, ob Sin3p an den *EFG1*-Promotor bindet. Um eine Interaktion der Sin3p-Histondeacetylase mit dem *EFG1*-Promotor nachzuweisen, wurde

wiederum die Methode der Chromatinimmunpräzipitation genutzt. Hierzu wurde eine C-terminale Fusion des Sin3-Proteins mit dem FLAG-Epitop unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors exprimiert. Zur Überprüfung der Expression und der Präzipitierbarkeit des Proteins wurde zunächst eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt. Nach Induktion des *PCK1*-Promotors können sowohl in Rohextrakten (A) als auch in Anti-FLAG-Immunpräzipitaten (B) drei spezifische Signale detektiert werden. Die errechnete Größe von Sin3p liegt bei etwa 150 kDa. Die drei detektierten Signale laufen bei einer Höhe von 80 kDa, 150 kDa und 180 kDa. Das mittlere Signal entspricht somit der errechneten Größe von CaSin3p, während die anderen Signale vermutlich auf ein Abbauprodukt bzw. eine modifizierte Form zurückzuführen sein könnten. Da das markierte Protein durch den Anti-FLAG Antikörper präzipitierbar war, konnte dieses für die ChIP genutzt werden. Bei *sin3*-Mutanten ist das Absinken des *EFG1*-Transkriptspiegels während der Hypheninduktion nicht zu beobachten. Aus diesem Grund, wurde die DNA-Bindung von Sin3p insbesondere unter hypheninduzierenden Bedingungen untersucht.

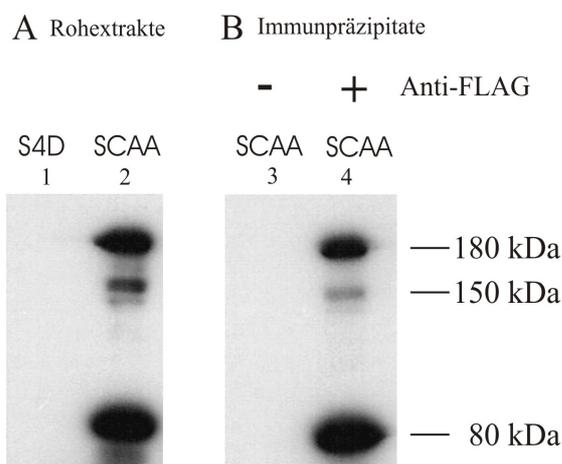
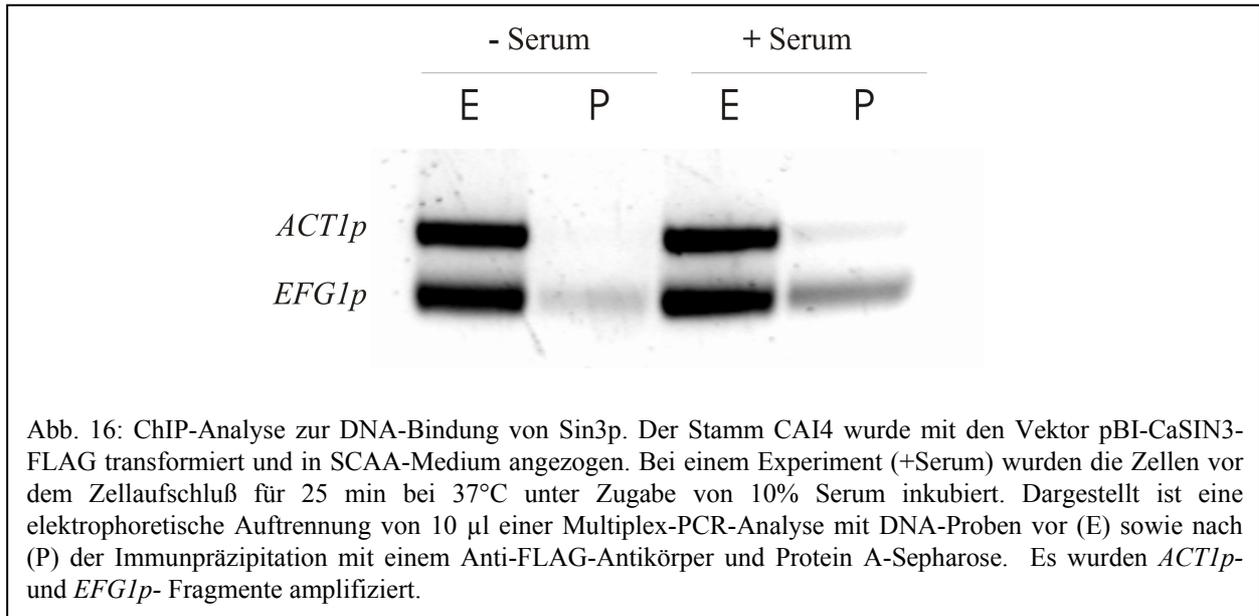


Abb. 15: Immunoblot-Analyse zum Nachweis der Expression von FLAG-Sin3p. A: Eine Transformante des Wildtyp-Stammes (CAI4) mit pBI-CaSin3FLAG wurde in S4D-(1) und in SCAA-Medium (2) angezogen. Je 40  $\mu$ l Rohextrakte wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. B: Je 200  $\mu$ l Rohextrakt des Wildtyp-Stammes (CAI4) transformiert mit pBI-CaSin3FLAG wurden mit (+) und ohne (-) Anti-FLAG-Antikörper und Protein A-Sepharose über Nacht inkubiert und präzipitiert. Je 20  $\mu$ l der Präzipitate wurden aufgetragen. Die Zellen wurden zur Induktion des *PCK1p* in SCAA-Medium angezogen. Die Detektion des Fusionproteins erfolgte mit einem Anti-FLAG-Antikörper.



Der FLAG-Sin3p-exprimierende Stamm wurde hierzu in SCAA-Medium angezogen. Bei einer  $OD_{600}=0,8$  wurde die Zellen in zwei Proben aufgeteilt. Während die eine Probe unverändert blieb, wurden der anderen Probe zur Hypheninduktion 10 % Pferdeserum hinzugegeben. Nach einer 25 minütigen Inkubation wurden beide Proben für die nachfolgende Chromatinimmunpräzipitation geerntet.

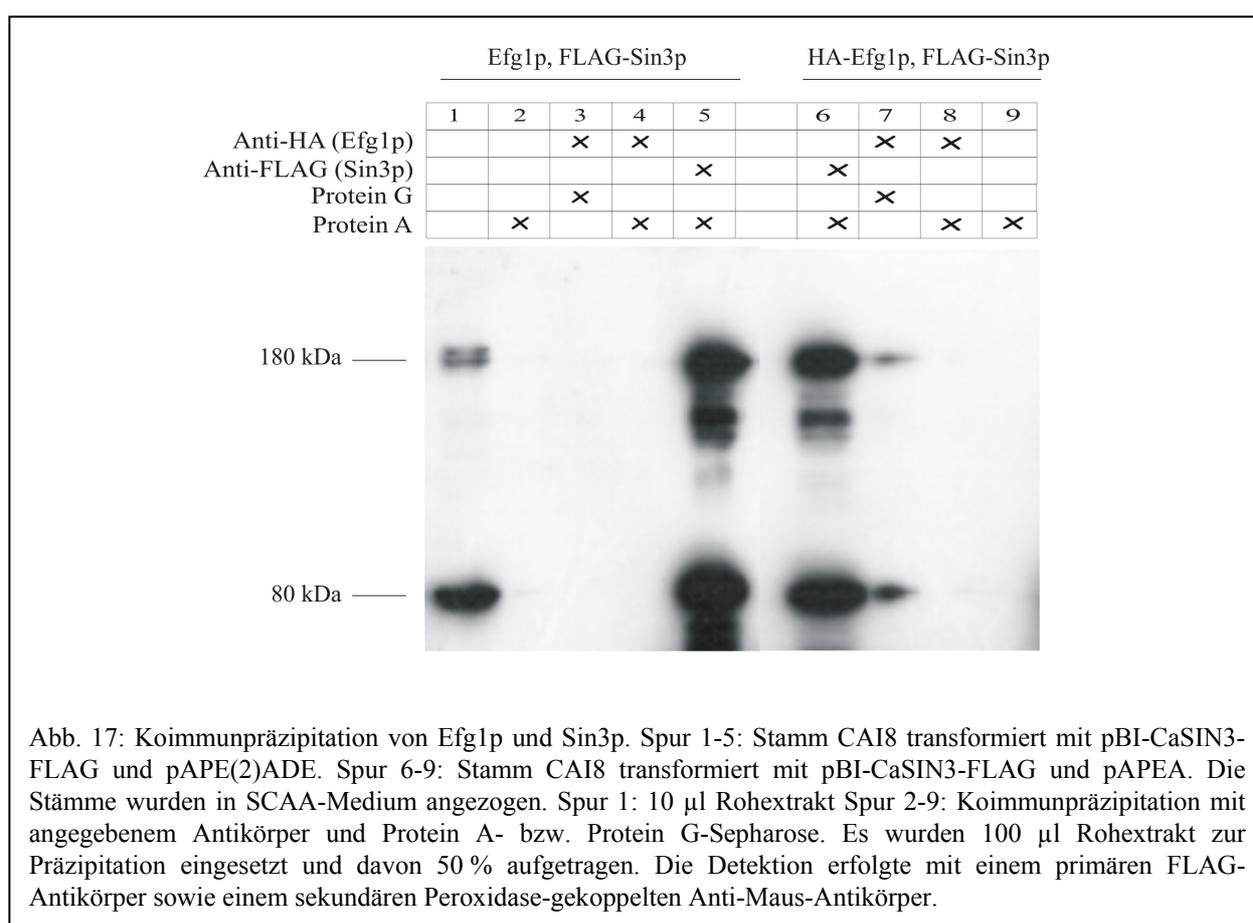
Die ChIP-Analyse in Abb. 16 zeigt, dass Sin3p ebenfalls wie Efg1p an den *EFG1*-Promotor bindet. Während vor der Präzipitation mit dem Anti-FLAG-Antikörper sowohl der *ACT1*- als auch der *EFG1*-Promotor detektierbar ist, kann nach der Präzipitation nur der *EFG1*-Promotor mittels PCR nachgewiesen werden. Bei einer 25 minütigen Inkubation mit 10 % Serum ist eine verstärkte Anreicherung des *EFG1*-Promotors im Präzipitat zu beobachten.

### 3.6 Interaktionsanalyse von Efg1p und Sin3p

#### 3.6.1 Koimmunpräzipitation von Efg1p und Sin3p

Die Koimmunpräzipitation ist ein biochemisches Verfahren zum Nachweis von Proteininteraktionen. Im Gegensatz zur Zwei-Hybrid-Methode kann hierbei mit dem Organismus gearbeitet werden, aus dem die zu untersuchenden Proteine stammen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass beispielsweise fehlende Modifizierungen der Proteine eine Interaktion verhindern. Um eine Interaktion der Proteine *in vivo* zu ermöglichen, wurden die zwei zu untersuchenden Proteine in der selben Zelle überexprimiert. Hierzu wurde der *C. albicans* Stamm CAI8, der zwei Selektionsmarker hat, mit den Plasmiden pBI-CaSIN3-FLAG (*PCK1p-SIN3<sub>FLAG</sub>*, *URA3*) und pAPEA (*PCK1p-EFG1<sub>HA</sub>*, *ADE2*) sowie als Kontrolle mit den Plasmiden pBI-CaSIN3-FLAG (*PCK1p-SIN3<sub>FLAG</sub>*, *URA3*) und pAPE(2)ADE (*PCK1p-EFG1*, *ADE2*) transformiert. Die Expression beider Proteine steht unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors und wurde durch Anzucht der Zellen in SCAA-Medium induziert. Nach Herstellung von Rohextrakten wurde Efg1p mit Hilfe des HA-Antikörpers immunpräzipitiert. Da Protein A und Protein G mit unterschiedlichen Affinitäten an den F<sub>C</sub>-Teil der Immunglobuline G

verschiedener Organismen binden (Björck und Kronvall, 1984; Moks *et al.*, 1986), erfolgte die Immunpräzipitation von Efg1p sowohl mit Protein A- als auch mit Protein G-Sepharose. Bei der darauf folgenden SDS-PAGE und Westernanalyse konnte an Efg1p gebundenes Sin3p mittels eines FLAG-Antikörpers nachgewiesen werden (siehe Abb. 17, Spur 7). Bei Benutzung von Protein-A-Sepharose zur Präzipitation konnte keine Interaktion gezeigt werden (Spur 8), allerdings konnten im Präzipitat nach Detektion mit einem HA-Antikörper nur geringe Mengen an präzipitierten Efg1p nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Kontrollstamm (Spur 2-5) wurde eine unmarkierte Efg1p-Version exprimiert. Wie erwartet konnte hier bei Präzipitation mit dem HA-Antikörper weder Efg1p (Daten nicht gezeigt) noch Sin3p im Präzipitat detektiert werden (Spur 3 und 4). Die Koimmunpräzipitation von Sin3p durch Efg1p lässt somit auf eine *in vivo* Interaktion der beiden Proteine schließen.

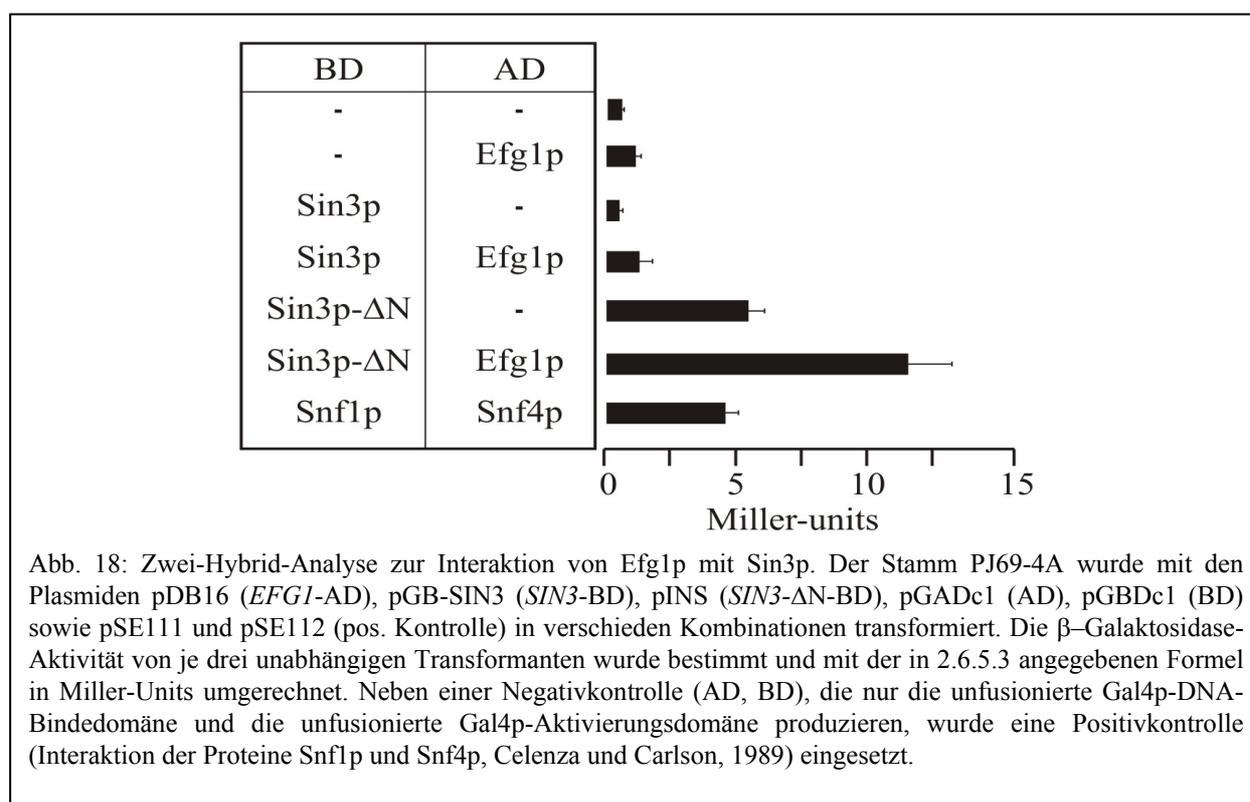


### 3.6.2 Zwei-Hybrid Analyse von Efg1p und Sin3p

Um die Interaktion von Efg1p und Sin3p zu bestätigen, wurde neben der Koimmunpräzipitation auch eine Zwei-Hybrid-Analyse durchgeführt. Bei der von Fields und Song (1989) entwickelten Methode werden die zu untersuchenden Proteine an die Gal4p-DNA-Bindedomäne bzw. die Gal4p-Aktivierungsdomäne fusioniert und in einem speziellen *S. cerevisiae* Reporterstamm produziert. Bei einer Interaktion der Proteine kommt es zu einer Aktivierung der in den Stamm integrierten Reportergene *lacZ*, *HIS3* sowie *ADE3*. Das Wachstum des auxotrophen Stammes auf

Adenin-freiem- bzw. Histidin-freiem Medium, sowie die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wird hierbei als Maß für die Stärke der Interaktion betrachtet.

Da das *SIN3*-Gen zwei Introns enthält, welche möglicherweise in *S. cerevisiae* nicht entfernt werden, wurde zusätzlich ein Plasmid (pINS) genutzt, bei dem eine N-terminal verkürzte Version von *SIN3* exprimiert wird. Hierbei werden lediglich die letzten 751 Aminosäuren des dritten Exons produziert (Sin3p- $\Delta$ N). Zur Interaktionsanalyse wurde der Stamm PJ69-4A mit den Plasmiden pDB16(*EFG1*-AD), pGB-Sin3 (*SIN3*-BD), pINS (*SIN3*- $\Delta$ N-BD), pGADc1 (AD) und pGBDc1 (BD) in verschiedenen Kombinationen transformiert. Als Positivkontrolle diente die Interaktion der Proteine Snf1p (pSE111) und Snf4p (pSE112) (Celenza und Carlson, 1989). Auf Kontrollplatten, die kein Leucin und Tryptophan enthielten, waren alle Transformanten in der Lage zu wachsen, das heißt sie enthielten jeweils die zwei eingebrachten Plasmide für die potentiellen Interaktionspartner (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Interaktionsanalyse sind in Abb. 18 zu sehen.



Ein Wachstum auf Adenin-freiem Medium kann nur bei einer starken Interaktion der Proteine beobachtet werden, während Wachstum auf Histidin-freiem Medium, sowie die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase, auch bei schwachen Interaktionen nachzuweisen ist. Bei keinem der Transformanten, inklusive der Positivkontrolle, konnte ein Wachstum auf Adenin-freiem Medium beobachtet werden. Auf Histidin-freiem Medium wuchsen hingegen sowohl die Positivkontrolle, als auch Transformanten, welche die N-terminal verkürzte *SIN3*-BD-Fusion exprimieren (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung bestätigen, dass die Expression des verkürzten Sin3-Proteins (Sin3p- $\Delta$ N) fusioniert an die Gal4-Bindedomäne bereits alleine zu einer verstärkten *lacZ*-Aktivität führt (siehe Abb. 18). Obwohl

bei zusätzlicher Expression der *EFG1*-Fusion an die *GAL4*-Aktivierungsdomäne kein verstärktes Wachstum auf Histidin-freiem Medium zu beobachten war, konnte eine signifikant höhere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Interaktion von Efg1p und Sin3p aus den Koimmunpräzipitationsexperimenten (siehe 3.6.1).

Bei der Expression des kompletten Sin3-Proteins in Kombination mit Efg1p ist weder ein Wachstum auf Histidin-freiem Medium, noch ist eine gesteigerte *lacZ*-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten.

### 3.7 Regulation des *EFH1*- und *EFG1*-Promotors

Die Expression von *EFG1* ist autoreguliert und wird während der Hypheninduktion stark abgesenkt (Tebarth *et al.*, 2003). Auch die Überexpression von *EFH1* führt zu einer Repression des *EFG1*-Promotors. Um zu überprüfen, inwieweit Efg1p und Efh1p die eigene Expression, als auch die Expression des jeweils anderen APSES-Proteins beeinflussen, wurden Reporterstudien durchgeführt, bei denen die Promotoren an das Reportergen *RLUC* aus *R. reniformis* fusioniert sind.

#### 3.7.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes und Analyse des Promotors von *EFH1*

Als Promotor eines Gens wird typischerweise die Region bezeichnet, die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegt und die Informationen für die geregelte Expression des Gens enthält. Oftmals liegt der Transkriptionsstartpunkt jedoch nicht direkt vor dem Startkodon ATG, sondern kann, wie im Falle von *EFG1*, durch eine untranslatierte Region bis zu 1 kb vom Startkodon entfernt sein. Da keine Informationen über die Transkriptgröße von *EFH1* vorlagen, wurde zunächst der Startpunkt der Transkription bestimmt. Hierzu wurde die Methode der 5'-RACE („rapid amplification of cDNA ends“) durchgeführt. Ausgehend von einer Gesamt-RNA aus dem *C. albicans* Stamm SC5314 wurde die *EFH1*-mRNA mit Hilfe des Oligonukleotids EFH-outer2 in eine Komplementär-DNA umgeschrieben. Diese wurde durch zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen mit den Primern EFH-outer und EFH-inner amplifiziert und anschließend in den Vektor pMOS-Blue kloniert. Auf diese Weise wurden drei Plasmide erhalten, die anschließend sequenziert wurden. In Abb. 19 ist die Position der ermittelten Startpunkte markiert. Bei zwei der Plasmide lag der Startpunkt bei -100 bp und bei einem Plasmid bei -118 bp.

```

-2028 GCAATGAATCTTAGTTTACCCGAAATCTGTGTTTTTTCAATAACCTACTTCAAACATAAC
      EFH1p-5'
-1968 TGAATCGTACCATGATTTTGGTGAACTTTAATCTTTTTTTATTCTCCCTTACTAATA
-1908 TTATTTCAAGCAAACCCCTCAATCTTCAATGAAAAATCTTGTTTGAACATTGCACTTAAA
-1848 AGATGCTAAGAAATAAAATAGAAGTTGAAAAGATCAACAAAAACACTAATTGACAATTG
-1788 TTGGTCTTTATTGGGTTGGTAATGGAACACAGGAGAACCAAGAAAAAAGCACACTATTGA
-1728 CAATGAAAAAAATTTTCACATATCATGTCAACAATGAGATTATAATTCAGTTTGATAAT
      UAS1NO
-1668 TTCTTTTCAGGTTTATTATTTTCTTGTCACCTAAGATTATTAACTTATCATAGTTATTAT
      AP-1
-1608 TTAATGGTTTCAAAAAATATTTTAATATATTTGTTAAGGTGCTGGGAGGAATTTGTCAGC
-1548 CATATCATATTATTATTATTATTATATATTTTAAAGCTTTTATTATTATTTTCCATTAT

```

```

-1488 CATTATTATCAATTTAGTTTTGCTCTTTCATCTTGTCTTTAGTTTTACTTTTTCTTAG
-1428 TTTTTGTGTAAGTAAAGTCTGTTTTATTTTTGATGTCATTTTCAACCACGAAAAAGTTT TT
                                     SCB
-1368 TATTGTTTTTTGGGGTTGCACGATTCTTTTTCTATTGTTTGATTTTTGCAATTTTCTATT
      Rox1p                               Rox1p
-1308 CCCTTCTTTTGCTTTGCTTTTTTGTCTTATTTTCGATTTACGCCCTCCAATTTCCATAAG
-1248 ATTACAAAAATCACAACTTTTTATAGTCTTAAACTTTCAAGGGAACAAAAATAAAATAA
-1188 TATTTGCTTCTAGGCCTGATTAGAATATGATTTCCGATTATTATTATATTCAAATATTCA
-1128 AGAATAATTATTTTAAATCATTACTTATATTTCTCCTATTACCCAGATGAGAAACAAGAAA
      HSTF
-1068 TACACCCTACTACCAATAACAACAACAATAATAATAATCACCCTTTTAATAAAAAAATGG
                                     BAS2          AP-1
-1008 GTAAAAATTCTAAACAATTGACTACGAGATAAAACTGTTAATAATATTTTTATTTTATTA
                                     GCN4          BAS2
-948  GTCAAGAGTTTTGACGTATAAAATCTAAACAATTTCTCCCCCCCCCTCCTTCCGTTATCC
-888  CCCTCTTTTTCTTTTTCAATTTTCCACTTTTTAAGAGAATAATTTTGGCATCATATTTAG

-828  ACGCAGTTATTTTCAGCGAATTTCAAGTATACTCTTATATTGGTTTTAGTTTTATTAAA
                                     HSTF          Bst1107I
-768  TAATAAAAAGAGCTCTATGATTTCAATTTAGTTCCAATACAAAACAAGATAATATACTCAA
      BAS2
-708  AACATTTACATCAAAATAATAAACGAAAGAAAACGGAGATTCCATATTTATTTATTGTCA
                                     BAS2
-648  ATTCATTTTATAAACTAGAGTATTCTGAAATACCTCATAACACACCAAAACAATACAAAA
      TBP
-588  ATAGGTTGAATAGAATACGAGTAATTGAAGAAACCAAAACTGTTGTGAAATAAAAAATAAC
-528  AATTAATAAACACCAGAAGTTTCCTTAATTATTTAAGAAGTAAAAAAAAAAAAAGAAAAAT
      BAS2          HSTF
-468  ACAGTAGTTTCATATTACAGAAGTTTACGTTCCCTAATATTTGCAGTTACTACAATCTTCCT
-408  AAATAACTTACAAGTTTATTTTTAACTAGAGTTATTTATTTCAACTACTATACTTTTTAAG
348   ATCACCATAGTGTTAAATCTTACTTGTTTTCCGTTGAATTTTCCTTGATTTGGAGATTCC
                                     HSTF
-288  CTA AAAATCAAAAGTGAATAAAAGAAAAGGGAATCTATATCACTGATCTTTCTTGATTCA
                                     GCN4
-228  TTAATAGATAGTATAATATTTTGAGTAAGTATCTTTACTGAATTTGGTTTTCTTTTTAAT
      TBP          GCN4          GCN4
-168  TGTGCTGCTATTAGTTTGTCACTCGATACTATTGTTATCTGTTGATTTTGTACATTCTT
                                     TSP1
-108  GTTGGTTCCTCCACAGTAATAAATAGGAGCTACCCCCAAAATCATTATTTATTTAATAAATT
      TSP 2,3
-48   TGCTTCAAACATTAATCTCGTTATAAGTATATTCACATATTTTATAAAATGAATGGTATT
                                     EFH1-3'                               M N G I

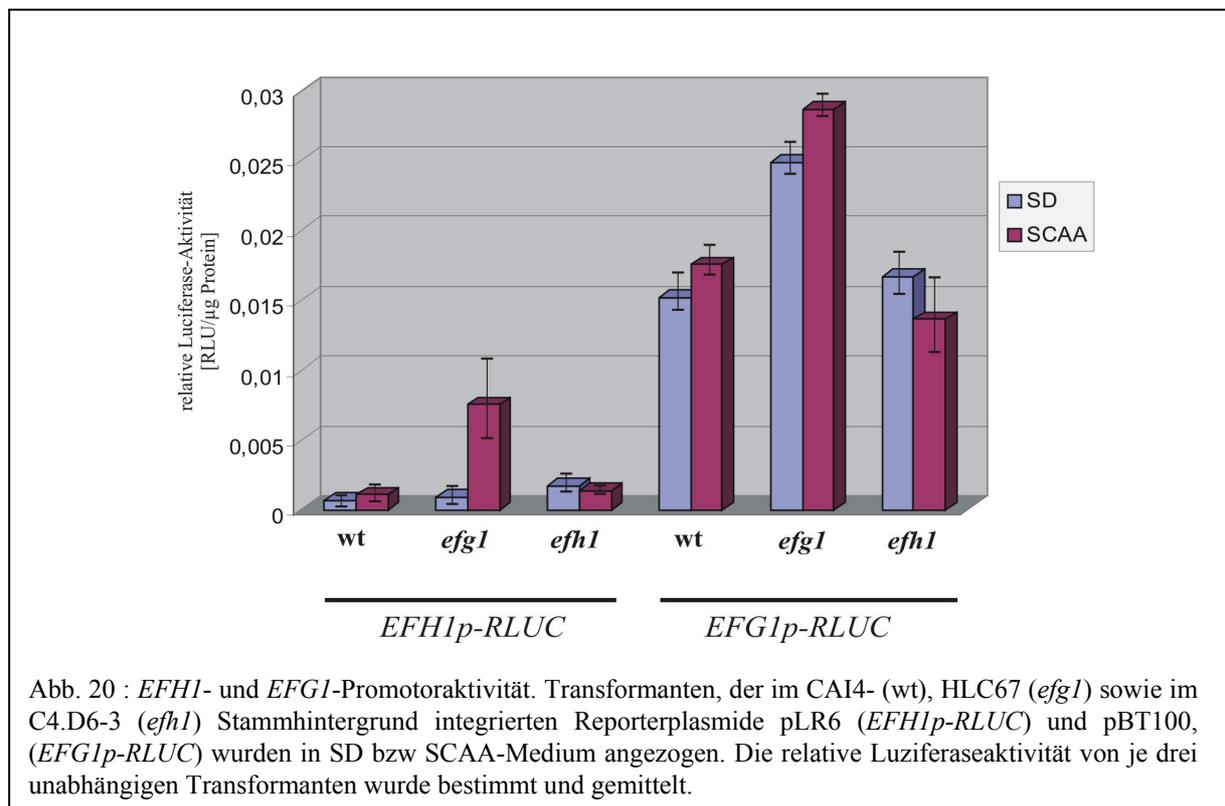
```

Abb. 19: DNA-Sequenz der 5'-Promotoregion des *C. albicans* *EFH1*-Gens. Die Ziffern bezeichnen den Abstand der Nukleotide vor dem Translationsstart (ATG). Die bestimmten Transkriptionsstartpunkte sind fett gedruckt und als TSP1 und TSP2,3 bezeichnet. Die zur Amplifikation des *EFH1p* genutzten Primer, die zur Integration der Reporterkonstrukte genutzte *Bst*1107I-Schnittstelle, sowie potentiellen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren sind fett gedruckt.

Im Promotorbereich von Genen befinden sich Bindestellen für Transkriptionsaktivatoren, die als UAS (upstream activating sequence) oder URS (upstream repressing sequence) bezeichnet werden und für die Regulation der Genexpression verantwortlich sind. Bei der Analyse des *EFH1*-Promotors konnten einige Sequenzen identifiziert werden, welche in der Regulation bekannter Gene eine Funktion besitzen. So sind beispielsweise zwei Bindestellen für den Repressor Rox1p vorhanden, der in *S. cerevisiae* für die Repression hypoxischer Gene verantwortlich ist (Balasubramanian *et al.*, 1993). Kürzlich wurde in *C. albicans* ein homologes Protein zu Rox1p beschrieben, welches zwar nicht in der Repression hypoxischer Gene, jedoch in der Regulation filamentösen Wachstums involviert ist (Kadosh und Johnson, 2001, Khalaf und Zitomer, 2001).

### 3.7.2 *EFH1*- und *EFG1*-Promotoraktivität in verschiedenen Stämmen

Nachdem der Transkriptionsstartpunkt von *EFH1* bekannt war, wurde die stromaufwärts liegende Region durch eine PCR mit den Primern *EFH1p-5'* und *EFH1p-3'* amplifiziert und anschließend vor das Reporter-gen *RLUC* kloniert. Das entstandene Plasmid (pLR6) wurde durch Restriktion mit der Endonuklease *Bst1107I* linearisiert und zur genomischen Integration in den *EFH1*-Promotor in verschiedene Stämme transformiert. Die Fusion des *EFG1*-Hauptpromotors an das *RLUC*-Gen (Tebarth, 2001) wurde ebenfalls durch Linerarisierung (*HpaI*) in den genomischen *EFG1*-Promotor integriert. Die korrekte Integration der Plasmide wurde durch eine PCR auf genomischer DNA verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Luziferase-Messung sind in Abb. 20 dargestellt. Die Messungen zeigen, dass der *EFH1*-Promotor im Vergleich zu dem *EFG1*-Hauptpromotor etwa 20-fach schwächer ist. Messungen des kompletten *EFG1*-Promotors inklusive der untranslatierten Region (*UTR*) zeigten sogar eine bis zu 1000-fach höhere Aktivität als ohne die *UTR* (Lengeler, pers. Mitteilung). Die geringe Aktivität des *EFH1*-Promotors korreliert mit der Tatsache dass in Northernblot-Analysen ein *EFH1*-Trasnkript nur bei sehr langer Inkubation mit der Sonde nachgewiesen werden konnte (Tebarth, 2001). Ebenfalls wird in der Abb. 20 deutlich, dass der *EFH1*-Promotor in der *efg1*-Mutante bei Wachstum in glukosefreien SCAA-Medium eine siebenfach höhere Aktivität zeigt. Auch die Aktivität des *EFG1*-Promotors ist in der *efg1*-Mutante deutlich erhöht, allerdings unabhängig von der Kohlenstoffquelle. Dies bestätigte die bereits gut untersuchte negativ autoregulatorische Funktion von *EFG1* (Tebarth, 2001, Doedt, 2000). Die Deletion von *EFH1* zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität der beiden Promotoren, obwohl Tebarth (2001) bei Überexpression von *EFH1* eine Reprimierung des *EFG1*-Promotors beobachtete. Der *EFH1*-Promotor wurde bei Überexpression von *EFG1* bzw. *EFH1* im Stamm CAI8 nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).



### 3.8 Genomweite Transkriptomanalyse

Überexpressionsstudien des Transkriptionsfaktors Efh1p zeigen, dass dieser ebenfalls wie Efg1p an der Regulation des filamentösen Wachstums von *C. albicans* beteiligt ist (siehe 3.1). Während die *efg1*-Mutante starke Defekte in der Hyphen- und Chlamydosporenbildung aufweist, konnten für die *efh1*-Mutante nur wenige phänotypischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp identifiziert werden. Obwohl Hinweise auf die Regulation einiger hyphenspezifischer Gene durch Efg1p vorhanden sind, konnten bis auf *EFG1* selbst (siehe 3.5) keine direkten Zielgene nachgewiesen werden. Um mehr Einblicke in die Funktion und Rolle von Efh1p und Efg1p zu bekommen, wurden im folgenden genomweite Transkriptomanalysen der *efh1* und *efg1* Mutanten, der *efg1-efh1*-Doppelmutante, sowie von Stämmen, die *EFG1* oder *EFH1* überexprimieren, durchgeführt.

Es wurden kommerzielle DNA-Microarrays der Firma Eurogentec genutzt, welche mit 6039 Offenen Leserastern etwa 98 % der Gene von *C. albicans* enthalten. Die markierte cDNA von je zwei zu vergleichenden Proben wurde mit einem DNA-Microarray hybridisiert. Nach dem Waschen und dem Scannen der Arrays erfolgte die Normalisierung und statistische Auswertung der Daten mit Hilfe der Computerprogramme Genespring (Silicon Genetics) und SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>, Tusher *et al.* 2001). In Abb. 22 ist exemplarisch das

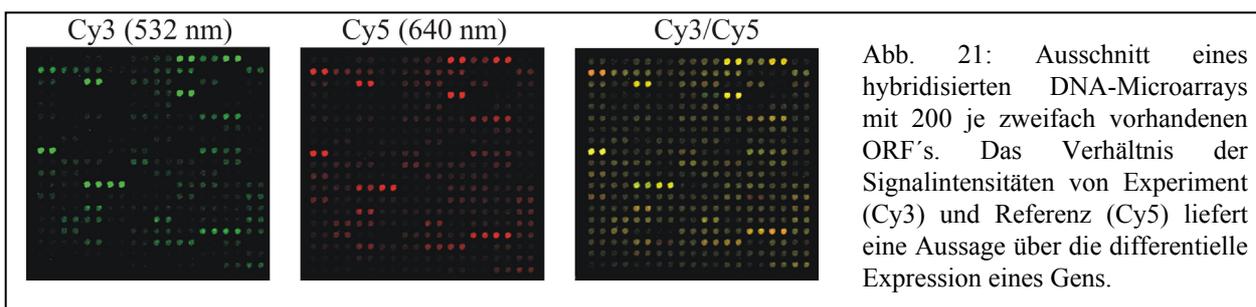


Abb. 21: Ausschnitt eines hybridisierten DNA-Microarrays mit 200 je zweifach vorhandenen ORF's. Das Verhältnis der Signalintensitäten von Experiment (Cy3) und Referenz (Cy5) liefert eine Aussage über die differentielle Expression eines Gens.

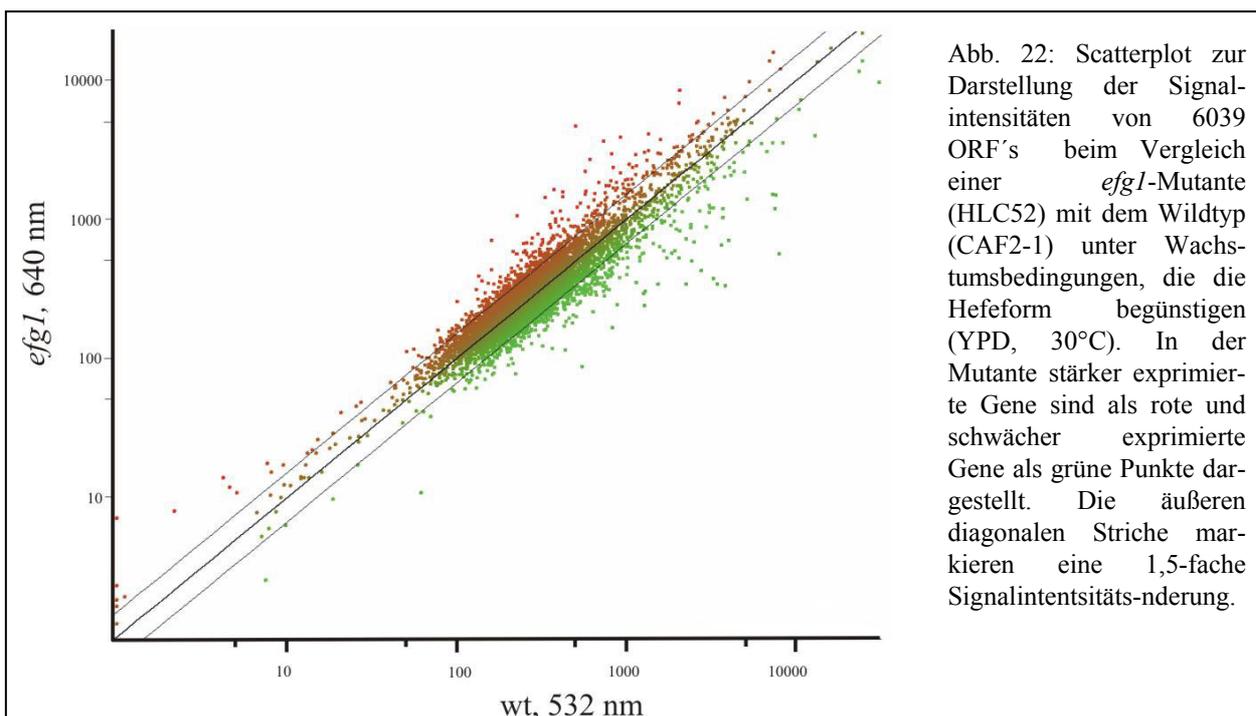


Abb. 22: Scatterplot zur Darstellung der Signalintensitäten von 6039 ORF's beim Vergleich einer *efg1*-Mutante (HLC52) mit dem Wildtyp (CAF2-1) unter Wachstumsbedingungen, die die Hefeform begünstigen (YPD, 30°C). In der Mutante stärker exprimierte Gene sind als rote und schwächer exprimierte Gene als grüne Punkte dargestellt. Die äußeren diagonalen Striche markieren eine 1,5-fache Signalintensitätsänderung.

Ergebnis eines Vergleichs der *efg1*- Mutante mit dem Wildtyp als so genannter Scatterplot dargestellt. Hierbei werden die Signalintensitäten jedes einzelnen Gens unter den beiden Bedingungen graphisch dargestellt. Gene, welche unter beiden Bedingungen in gleichem Maße exprimiert werden, sind bei dieser Art der Darstellung auf der Winkelhalbierenden zu finden. Differenziell exprimierte Gene hingegen, sind oberhalb bzw. unterhalb dieser Linie lokalisiert. Um auch kleine Änderungen im Expressionsniveau einzelner Gene beobachten zu können, ist es notwendig die Ergebnisse aufgrund experimenteller und biologischer Variabilität statistisch abzusichern. Im Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb für jede Auswertung mindestens drei Hybridisierungen (Replikate) durchgeführt. Die cDNA dieser drei Hybridisierungen stammte von drei unabhängigen RNA-Präparationen und soweit möglich auch von drei isogenen Stämmen. Da die zur Markierung der cDNA genutzten Fluorochrom-Farbstoffe mit einer leicht unterschiedlichen Effizienz in die DNA eingebaut werden, wurde des Weiteren bei einem der drei Experimente ein Farbtasch durchgeführt („dye swap“).

Jedes offene Leseraster (ORF) ist auf den eingesetzten DNA-Chips zweimal vorhanden, so dass sich für einen ORF sechs Verhältniswerte ergeben. Die Verhältnisse (Signalintensität Experiment dividiert durch Signalintensität Referenz) der sechs Einzelwerte wurden für weitere Analysen gemittelt. Abb. 23 zeigt exemplarisch anhand von vier unabhängigen Hybridisierungen (*efg1*, YPD verglichen mit Wildtyp, YPD) und einer Auswahl an Genen, dass leichte Unterschiede in den einzelnen Replikaten vorhanden sind, diese insgesamt jedoch ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufweisen. Als reguliert wurden in allen Experimenten nur diese Gene bezeichnet, die eine mit Hilfe des Programms SAM ermittelte statistisch signifikante Abweichung von der Referenz zeigten. Des Weiteren wurden in die im Anhang aufgeführten Genlisten lediglich die Gene aufgenommen, die zusätzlich im Mittel eine mindestens 1,5-fache Änderung zur Referenz zeigten.

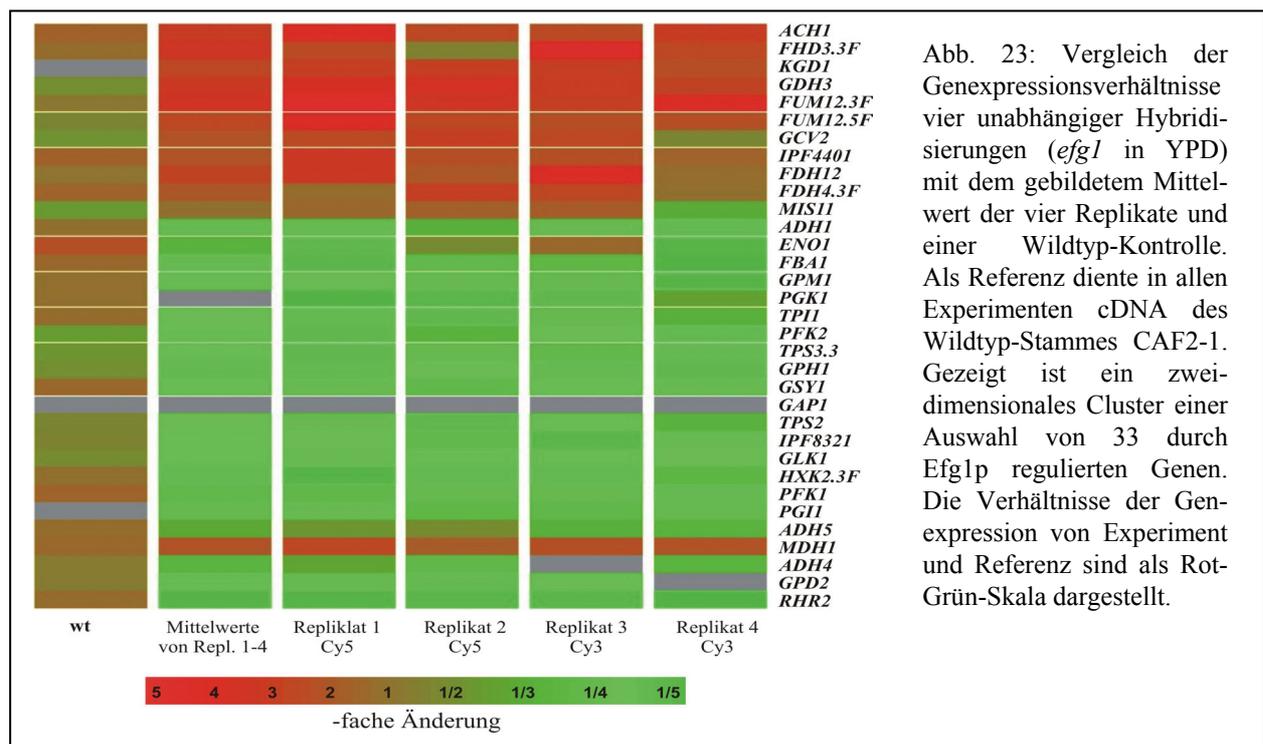


Abb. 23: Vergleich der Genexpressionsverhältnisse vier unabhängiger Hybridisierungen (*efg1* in YPD) mit dem gebildetem Mittelwert der vier Replikate und einer Wildtyp-Kontrolle. Als Referenz diente in allen Experimenten cDNA des Wildtyp-Stammes CAF2-1. Gezeigt ist ein zweidimensionales Cluster einer Auswahl von 33 durch *Efg1p* regulierten Genen. Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt.

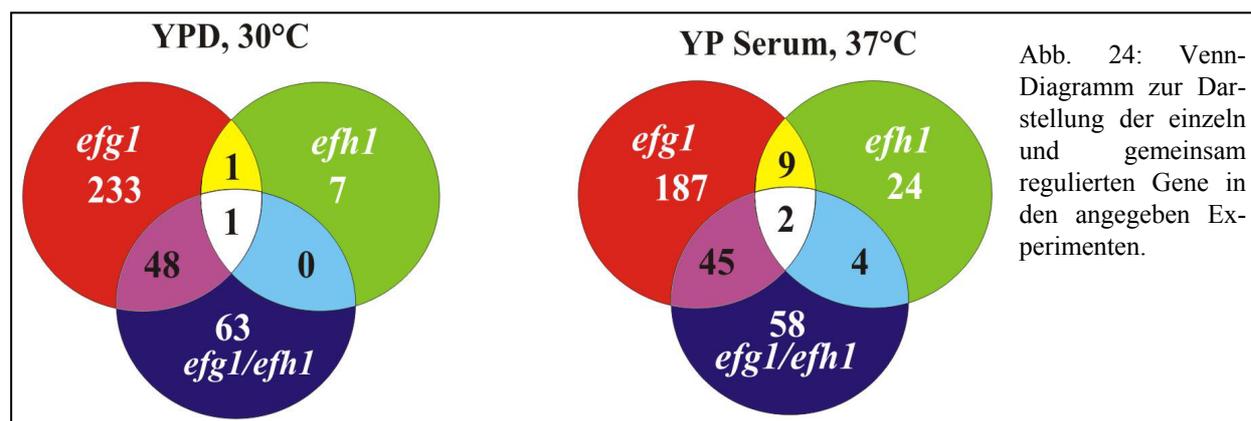
### 3.8.1 Transkriptomanalyse der *efg1*- und *efh1*-Einzelmutante sowie der *efg1/efh1*-Doppelmutante

Neben der Transkriptomanalyse unter „normalen“ Wachstumsbedingungen (Vollmedium und 30°C) sollte der Einfluss der beiden Proteine auch unter hypheninduzierenden Bedingungen untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es, insbesondere die Gene zu identifizieren, welche im frühen Stadium der Hypheninduktion durch Efg1p reguliert werden. Da der Prozess der Hyphenbildung nach Induktion sehr schnell verläuft (nach ~90 min sind 100 % der Zellen in der Hyphenform) wurden die Zellen nach 30 minütiger Induktion (siehe 2.6.1.1) geerntet. Die Tab. 12 zeigt einen Überblick über die durchgeführten Hybridisierungen und die im Versuch eingesetzten Stämme.

Tab. 12: Übersicht über die durchgeführten Hybridisierungen

Experiment-Bezeichnung	Experiment	Referenz	Replikate	Wachstumsbedingungen für beide Stämme
<i>efg1</i> , YPD 30°C	HLC52	CAF2-1	5	YPD, 30°C
<i>efh1</i> , YPD 30°C	C4.D6-3	CAF2-1	4	YPD, 30°C
<i>efg1/efh1</i> , YPD 30°C	H/1.22	CAF2-1	3	YPD, 30°C
<i>efg1</i> , Serum 37°C	HLC52	CAF2-1	3	YP +10% Serum, 37°C
<i>efh1</i> , Serum 37°C	C4.D6-3	CAF2-1	3	YP +10% Serum, 37°C
<i>efg1/efh1</i> , Serum 37°C	H/1.22	CAF2-1	3	YP +10% Serum, 37°C

Die Normalisierung und statistische Auswertung der Daten erfolgte wie in 2.6.1.6 beschrieben. Nach Auswertung aller Daten wurde insgesamt eine Anzahl von 615 Genen gefunden, welche zumindest in einem der 6 Experimente (Tab. 12) eine 1,5-fache statistisch signifikante Abweichung zeigten (siehe Anhang: Tab. 15 – Tab. 20). Wie in Abb. 24 ersichtlich hat die Deletion von *efg1* einen deutlich höheren Einfluss auf das Transkriptom als die Deletion von *efh1*. Während von Efg1p 283 bzw. unter hypheninduzierenden Bedingungen 243 Gene reguliert werden (Tab. 15 und Tab. 16), sind in der *efh1*-Mutante nur 9 bzw. 39 Gene differentiell exprimiert (Tab. 17 und Tab. 18). Der Einfluss der *efg1/efh1*-Doppelmutante auf das Transkriptom von *C. albicans* ist zwar geringer als der Einfluss der *efg1*-Einfachmutante, jedoch scheinen bei beiden zu einem großen Teil die selben Gene reguliert zu sein. So werden unter nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen 49 Gene und unter hypheninduzierenden Bedingungen 47 Gene von beiden Stämmen in gleicher Weise reguliert. Hiervon sind 12 Gene in beiden



Schnittmengen zu finden. Unter diesen 12 Genen kodieren, neben zwei unbekannt Genen (*IPF6881* und *IPF3937*), sieben Gene für Enzyme der Glykolyse (*ENO1*, *PFK1*, *PFK2*, *HXK2.3F*, *GLK1*, *PGI1* und *GPM1*), zwei Gene für Enzyme des Reservekohlenhydratstoffwechsels (*GSY1* und *IPF8321*) und ein Gen (*HSP12*) für ein Hitzeschockprotein. Beim Vergleich der *efg1/efh1*-Doppelmutante mit der *efh1*-Mutante zeigt sich, dass unter „normalen“ Wachstumsbedingungen nur ein Gen (*IPF4328*) und nach Hypheninduktion lediglich sechs Gene (*FTR1*, *SHM2*, *STF2*, *ECE1*, *MSB3* und *IPF4303*) in beiden Stämmen reguliert werden. Der Vergleich der *efg1* mit der *efh1*-Mutante zeigt, dass auch hier nur eine geringe Schnittmenge an gleich regulierten Genen zu finden ist. So sind unter nicht-hypheninduzierenden Bedingungen lediglich zwei unbekannte Gene (*IPF4328* und *IPF4696*) und nach Hypheninduktion 11 Gene in beiden Stämmen reguliert. Unter diesen sind neben vier unbekannt Genen (*IPF4959*, *IPF3647*, *IPF8806*, *IPF15870*), drei Gene (*RPL42.3*, *RPS6A*, *RPS12*), welche für ribosomale Proteine kodieren sowie die Gene *POT11*, *TUB2.3*, *FTR1* und *SHM2*.

Um Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Transkriptomprofilen aufzuzeigen, wurden so genannte Clusteranalysen (Eisen *et al.*, 1995) durchgeführt. Hierbei werden Gruppen (Cluster) von Genen gebildet, die in den vorgegebenen Experimenten ein ähnliches Expressionsniveau zeigen. Des Weiteren kann anhand eines Vergleichs der Expressionsniveaus dieser Gene, die Ähnlichkeit verschiedener Experimente gezeigt werden. Die Abb. 25 zeigt eine zweidimensionale Clusteranalyse der 615 Gene, welche in zumindest einem der 6 Experimente eine 1,5-fache signifikante Abweichung von der Referenz zeigten.

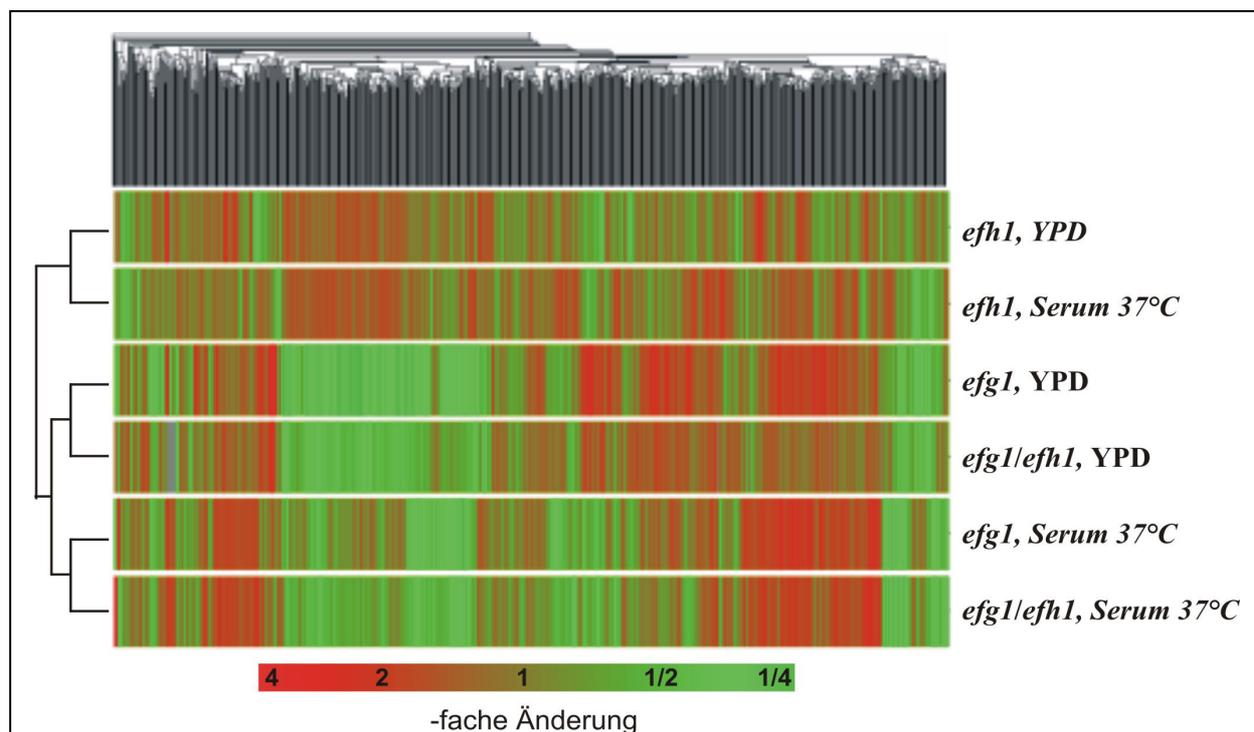


Abb. 25: Zweidimensionale Clusteranalyse von Genexpressionsverhältnissen. Die Clusteranalyse wurde mit 615 Genen durchgeführt, welche zumindest in einem der 6 Experimente eine 1,5-fache signifikante Abweichung von der Referenz zeigten (Zuordnung siehe Tab. 12). Die Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt. Ähnlichkeiten zwischen Genexpressionsmustern werden durch das horizontale Dendrogramm angezeigt. Das vertikale Dendrogramm zeigt Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Experimenten an.

Obwohl sich die Profile der *efg1*- und der *efg1/efh1*-Mutante nach Hypheninduktion nur im geringen Maße ändern, kann man anhand des vertikalen Dendogramms erkennen, dass die Transkriptomprofile der *efg1/efh1*-Doppelmutante ähnlicher zu denen der *efg1*-Mutante sind als die Profile der Stämme unter den zwei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Des Weiteren fällt auf, dass die Transkriptomprofile der *efh1*-Mutante zwar untereinander leicht ähnlich sind, aber wie bereits in Abb. 24 gesehen, keine Ähnlichkeit zu dem Profil der Doppelmutante zeigen.

### 3.8.1.1 Einfluss von Efg1p auf das Transkriptom

Der Transkriptionsfaktor Efg1p spielt eine entscheidende Rolle in der Morphogenese von *C. albicans*. Bisherige Untersuchungen zu möglichen Zielgenen von Efg1p beschäftigten sich meistens nur mit einer geringen Anzahl von hauptsächlich hyphenspezifischen Genen. So untersuchten Sohn *et al.* (2003) durch Microarray-Analysen den Einfluss von Efg1p auf Gene, die in die Zellwand Biosynthese involviert sind. Zwar benutzten Nantel *et al.* (2002) DNA-Microarrays, die nahezu das gesamte Genom von *C. albicans* repräsentierten, sie konzentrierten sich jedoch auf den Vergleich von hypheninduzierten Stämmen mit nicht-induzierten Stämmen. Nur in einem Experiment der Arbeit von Nantel *et al.* (2002) wurde das Expressionsprofil der *efg1*-Mutante mit dem Wildtyp unter normalen Wachstumsbedingungen verglichen. Es konnte allerdings nur eine geringe Anzahl an Genen identifiziert werden.

Mit Hilfe der DNA-Microarrays konnten in dieser Arbeit 283 Gene identifiziert werden, welche in der Hefewuchsform (YPD, 30°C) durch Efg1p reguliert werden. Unter hypheninduzierenden Bedingungen konnten 243 Gene identifiziert werden (siehe Anhang: Tab. 15 und Tab. 16). Die Abb. 26 zeigt eine Clusteranalyse von 51 besonders stark durch Efg1p-regulierten Genen. Die Proteine dieser regulierten Gene lassen sich in fünf Gruppen einteilen (Glykolyseenzyme, Enzyme des Reservekohlenhydratstoffwechsels, Histone, Zellwandproteine und Stressantwortproteine). Einige der am stärksten durch Efg1p regulierten Gene gehören in die Gruppe der Glykolyse (z.B. *FBA1*, *PFK1*, *ENO1*) (siehe Abb. 26A). Nahezu jedes Gen, welches für ein glykolytisches Enzym kodiert, ist in der *efg1*-Mutante sowie in der *efg1/efh1*-Doppelmutante eineinhalb bis dreifach geringer exprimiert als im Wildtyp. Ähnlich verhält es sich mit den Genen, die für Proteine der Trehalose- und Glykogensynthese (z.B. *TPS2*, *TPS3*, *GSY1*) oder der Zellwand (*IPF5185*) kodieren. Auch diese sind in den Stämmen, bei denen *EFG1* deletiert ist, geringer exprimiert. Gene, die für Proteine des Citrat-Zyklus (z.B. *FUM12*, *KGD1*, *IPF4401*) oder Histone (z.B. *HTB1*, *HHT21*) kodieren, sind hingegen stärker exprimiert und werden somit durch Efg1p reprimiert. Bei der Gruppe der Stressantwortproteine werden sowohl einige Gene durch Efg1p aktiviert (*HSP12*, *DDR48*) als auch reprimiert (*YHB1*). Neben den Genen, die für Proteine des Tricarbonsäure-Zyklus kodieren, wird eine weitere Gruppe von Genen, die ebenfalls für die aerobe Energiegewinnung nötig ist, in der *efg1*-Mutante verstärkt exprimiert und somit durch Efg1p reprimiert. Diese Gene (*ATP1*, *ATP17*, *PET9*, *NUBM* sowie *STF2*) kodieren für Komponenten der mitochondrialen Atmungskette und deren Regulation. Besonders auffällig ist weiterhin eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren (*CTA21*, *CTA24*, *CTA241.Exon1*, *CTA241.Exon2* und *CTA26*), welche in der *efg1*-Mutante höher exprimiert werden. Die Proteine dieser Genfamilie, die untereinander eine sehr hohe Homologie (bis zu 95 %) zeigen und zu denen es keine homologen Proteine in der Bäckerhefe gibt, sind in einem Screen nach möglichen Transkriptionsaktivatoren entdeckt worden (Kaiser, B. *et al.*, Genbankeintrag Nr.: CAA07164-CAA07172).

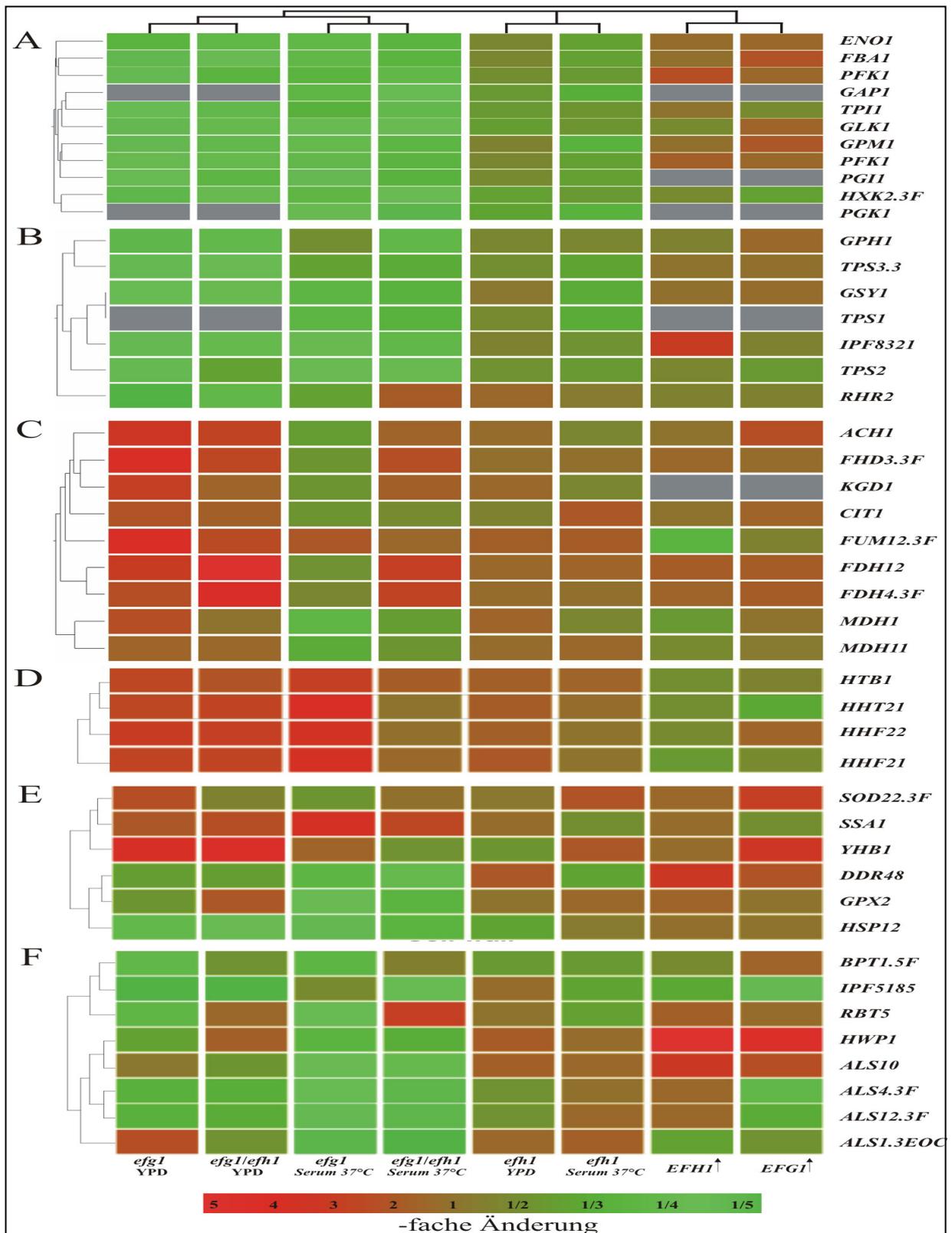


Abb. 26: Auswahl Efg1p-regulierter Gene. Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt (Zuordnung siehe Tab. 12). Die Gene wurden anhand der Funktion ihrer Proteine in Gruppen eingeteilt A: Glykolyse, B: Reservekohlenhydrate, C: Tricarbonsäure- und Glyoxylatzyklus, D: Histone, E: Stress, F: Zellwand.

Zwei weitere in der Mutante besonders verstärkt exprimierte Gene (*RPS620a* und *RPS620b*) zeigen ebenfalls eine sehr große Homologie zueinander. Die Funktion dieser Gene ist ebenso ungeklärt. Bis auf die Gene, die für Proteine des Citrat-Zyklus kodieren, werden alle in der Abb. 26 dargestellten Gene sowohl unter „normalen“ Wachstumsbedingungen, als auch unter hypheninduzierenden Bedingungen im gleichen Maße in *efg1*-Deletionsstämmen reguliert. Die für Proteine des Citrat-Zyklus kodierenden Gene, werden in der *efg1*-Mutante bei nicht-induzierenden Bedingungen stärker exprimiert, während sie unter Hypheninduktionsbedingungen eher schwächer exprimiert werden als der Wildtyp.

Um Informationen über das Expressionsniveau, der in Abb. 26 dargestellten Gene im Wildtyp zu erhalten, wurden die Signalintensitäten je sechs verschiedener Hybridisierungen des Wildtyps (hypheninduzierende und nicht-induzierende Bedingungen) gemittelt und durch das mittlere Expressionsniveau aller Gene unter diesen Bedingungen dividiert (siehe Abb. 27). Bei der Darstellung der relativen Expressionsniveaus wird deutlich, dass die für glykolytische Enzyme kodierenden Gene sowohl unter nicht-induzierenden als auch bei hypheninduzierenden Bedingungen bis zu 25-fach stärker exprimiert werden, als die mittlere Expression aller Gene.

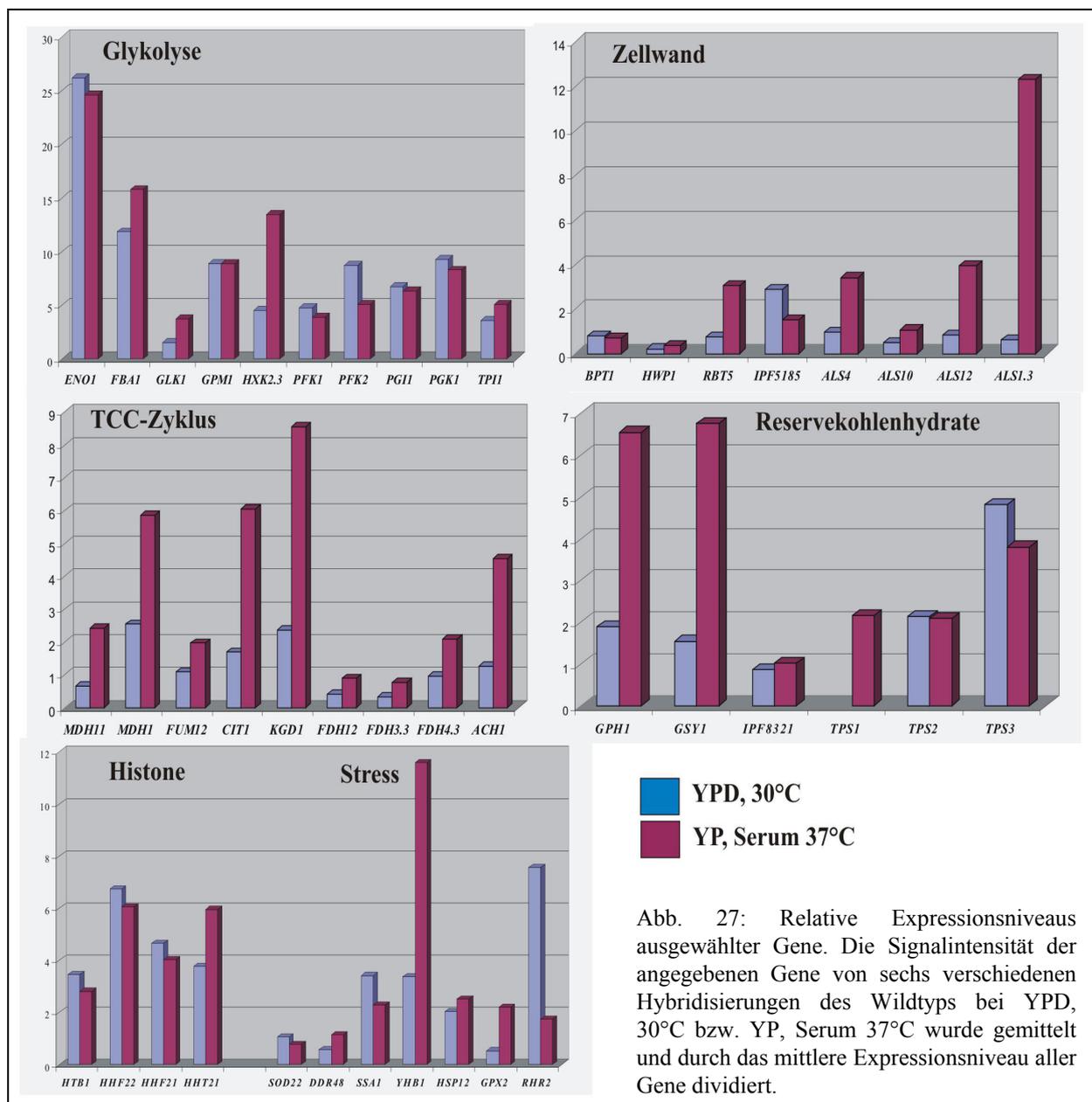


Abb. 27: Relative Expressionsniveaus ausgewählter Gene. Die Signalintensität der angegebenen Gene von sechs verschiedenen Hybridisierungen des Wildtyps bei YPD, 30°C bzw. YP, Serum 37°C wurde gemittelt und durch das mittlere Expressionsniveau aller Gene dividiert.

Die Expression der Gene, die für Proteine des Tricarbonsäure-(TCC)-Zyklus kodieren, entspricht unter normalen Wachstumsbedingungen in etwa dem durchschnittlichen Expressionsniveau aller Gene. Nach der Hypheninduktion werden diese Gene allerdings verstärkt exprimiert. Vor allem die Gene *ALS1* und *ALS12* heben sich hervor. Diese Gene, welche unter normalen Wachstumsbedingungen (YPD, 30°C) unterdurchschnittlich exprimiert werden, werden nach Hypheninduktion bis zu 20-fach stärker exprimiert. Das überdurchschnittliche Expressionsniveau der Gene *RHR2* und *IPF5185* (*FLO1*) hingegen sinkt nach der Hypheninduktion.

### 3.8.1.2 Hyphenspezifische Efg1p-regulierte Gene

Beim Vergleich der Transkriptome der *efg1*-Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen mit nicht-induzierenden Bedingungen fällt auf, dass der Großteil der Gene im gleichen Maße reguliert wird (siehe Abb. 28). Einige Gene ändern allerdings nach Hypheninduktion ihr Regulationsverhalten. Diese sind mit den Subclustern A1-A3 und B1-B3 gekennzeichnet und in einer Vergrößerung in Abb. 29 gezeigt. Nicht alle der hier aufgeführten Gene sind in den im Anhang aufgeführten Genlisten zu finden, da sie entweder nicht die minimale 1,5-fache Abweichung von der Referenz zeigten, oder aufgrund leichter Schwankungen der einzelnen Replikate bei der statistischen Auswertung herausgefiltert wurden. Unabhängig davon lässt sich jedoch anhand der Clusteranalysen erkennen, dass diese Gene nach der Hypheninduktion ihr Regulationsverhalten verändern. Die Gene der Subcluster A1-A3 sind unter nicht-hypheninduzierenden Wachstumsbedingungen durch Efg1p reprimiert und werden nach Induktion des filamentösen Wachstums durch Efg1p aktiviert. Zu diesen 35 Genen gehören 15 Genen mit unbekannter Funktion, drei Gene, die für ribosomale mitochondriale Proteine kodierende (*MRPL16*, *MRPL49*, *MRPS5*), fünf Gene die für Proteine des Citrat- und Glyoxylatzyklus kodieren (*MDH1*, *KGD1*, *FDH3.3F*, *FDH4.3F*, *FDH12*) und drei Gene deren Produkte in die Stressantwort involviert sind (*SOD22.3F*, *CAP1*, *IPF1218*). Andererseits werden 59 Gene, welche in der Hefeform durch Efg1p aktiviert werden, nach Hypheninduktion durch Efg1p reprimiert. Hierzu gehören Gene, die für Aminosäuretransporter (*AGP3*, *OPT2.3F*), den Fettsäurestoffwechsel (*POT1*, *POT11*, *SPS20*, *ERG13*) sowie Komponenten der Atmung (*DLD1*, *DLD2*, *EBP4*) kodieren.

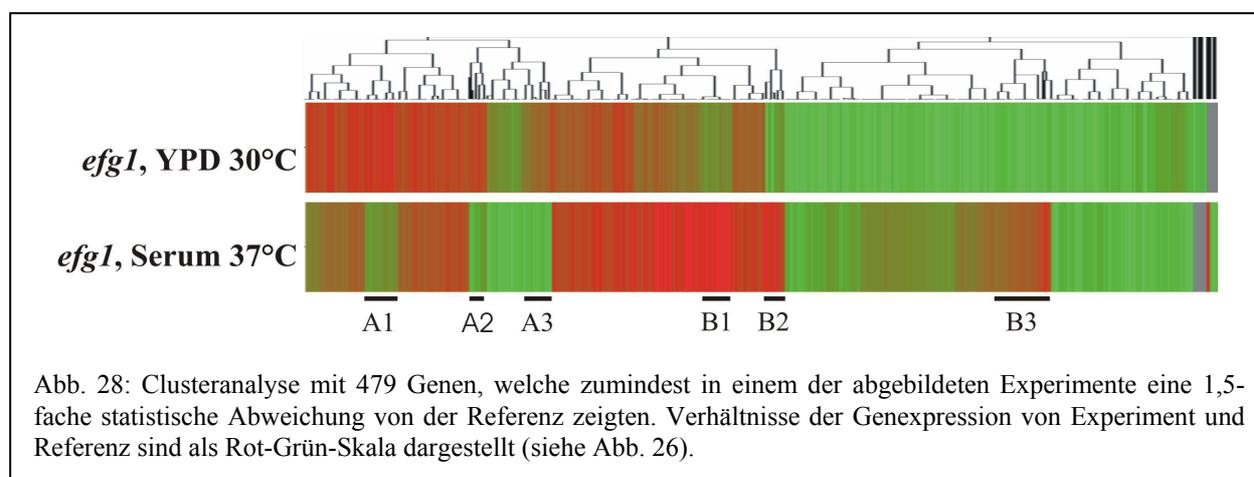


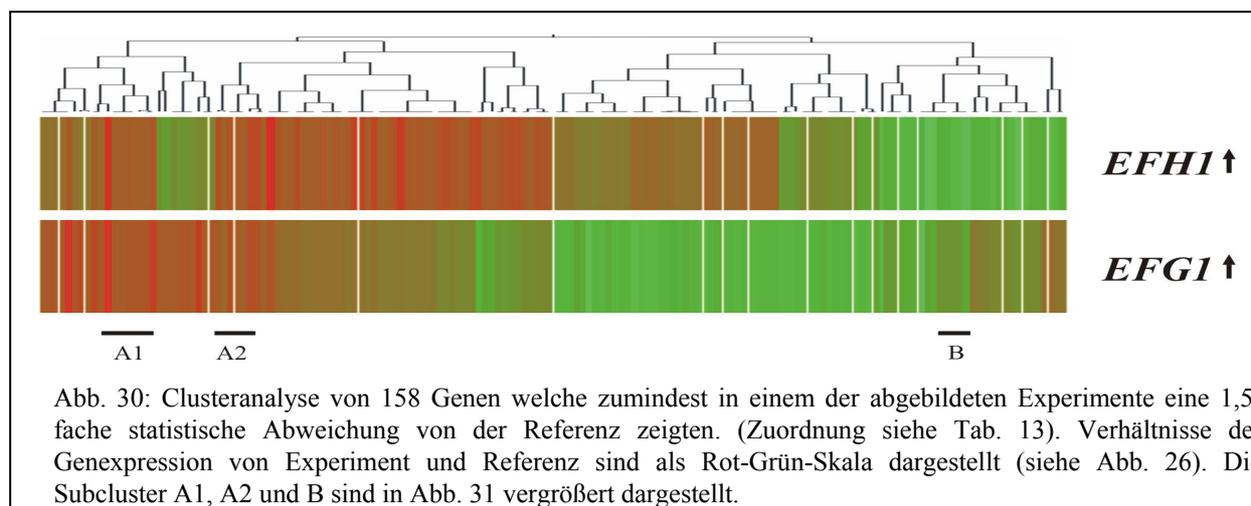
Abb. 28: Clusteranalyse mit 479 Genen, welche zumindest in einem der abgebildeten Experimente eine 1,5-fache statistische Abweichung von der Referenz zeigten. Verhältnisse der Genexpression von Experiment und Referenz sind als Rot-Grün-Skala dargestellt (siehe Abb. 26).



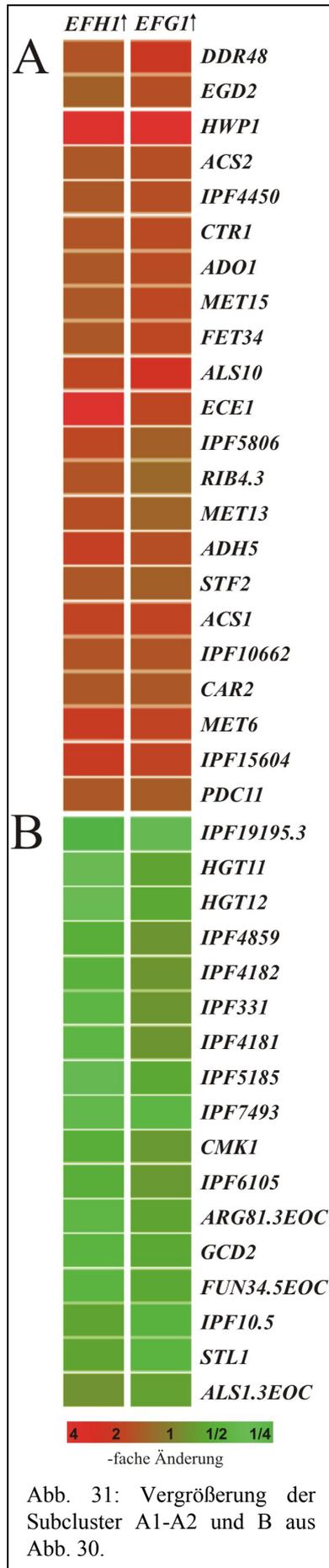
Microarrays mit Überexpressionstämmen durchgeführt. Hierzu wurde der Stamm CAI4 mit den Plasmid pDB35 (*PCK1-EFH1*) bzw. pRC2312P-H (*PCK1-EFG1*) transformiert. Als Referenz diente der mit einem Leervektor (pBI-1) transformierte Stamm CAI4. Aus Gesamt-RNA dieser Stämme wurde wie in 2.6.1 beschrieben cDNA hergestellt und diese wie in Tab. 13 angegeben zur Hybridisierung auf DNA-Microarrays eingesetzt.

Tab. 13: Übersicht über die durchgeführten Hybridisierungen bei der Transkriptomanalyse von *EFG1* und *EFH1*-Überexpressionstämmen.

Experiment-Bezeichnung	Experiment	Referenz	Replikate	Wachstumsbedingungen
<b><i>EFG1</i>↑</b>	CAI4, pRC2312P-H	CAI4, pBI-1	3	SCAA, 30°C
<b><i>EFH1</i>↑</b>	CAI4, pDB35	CAI4, pBI-1	3	SCAA, 30°C



Die Auswertung der Microarray-Daten der *EFG1*-Überexpression ergab 85 Gene (siehe Tab. 21), welche eine mindestens 1,5-fache signifikante Abweichung von der Referenz zeigten. Von diesen 85 Genen waren 32 Gene zwischen 1,5 und 19-fach höher und 53 Gene zwischen 1,5 und 3,5-fach niedriger exprimiert als die Referenz. Die hochregulierten Gene *ECE1*, *HWPI*, *RBT1*, *DDR48* und *PHR1* sind in der Literatur bereits als hyphenspezifische, Efg1p-regulierte Gene bekannt (Lane *et al.*, 2001b; Braun und Johnson, 2000). Sie kodieren bis auf *DDR48*, welches für ein Stressantwortprotein kodiert, für Zellwandproteine (Birse *et al.*, 1993; Sharkey *et al.*, 1999; Braun *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 1996). Auch das Gen *IPF1222*, welches für eine Superoxid-dismutase kodiert, ist durch Transkriptomanalysen als hyphenspezifisches Gen identifiziert worden. Nantel *et al.* (2002) bezeichneten dieses Gen als *SOD5*. Alle diese Gene werden sowohl nach der Hypheninduktion (Nantel *et al.*, 2002) als auch bei der *EFG1*-Überexpression aktiviert. Bei dem Gen *SAP4*, welches für eine sekretierte Protease kodiert, verhält es sich umgekehrt. Dieses Gen wird während der Hypheninduktion aktiviert (Chen *et al.*, 2002), aber ebenfalls wie *SAP1* und *SAP2* bei *EFG1*-Überexpression inaktiviert. Die

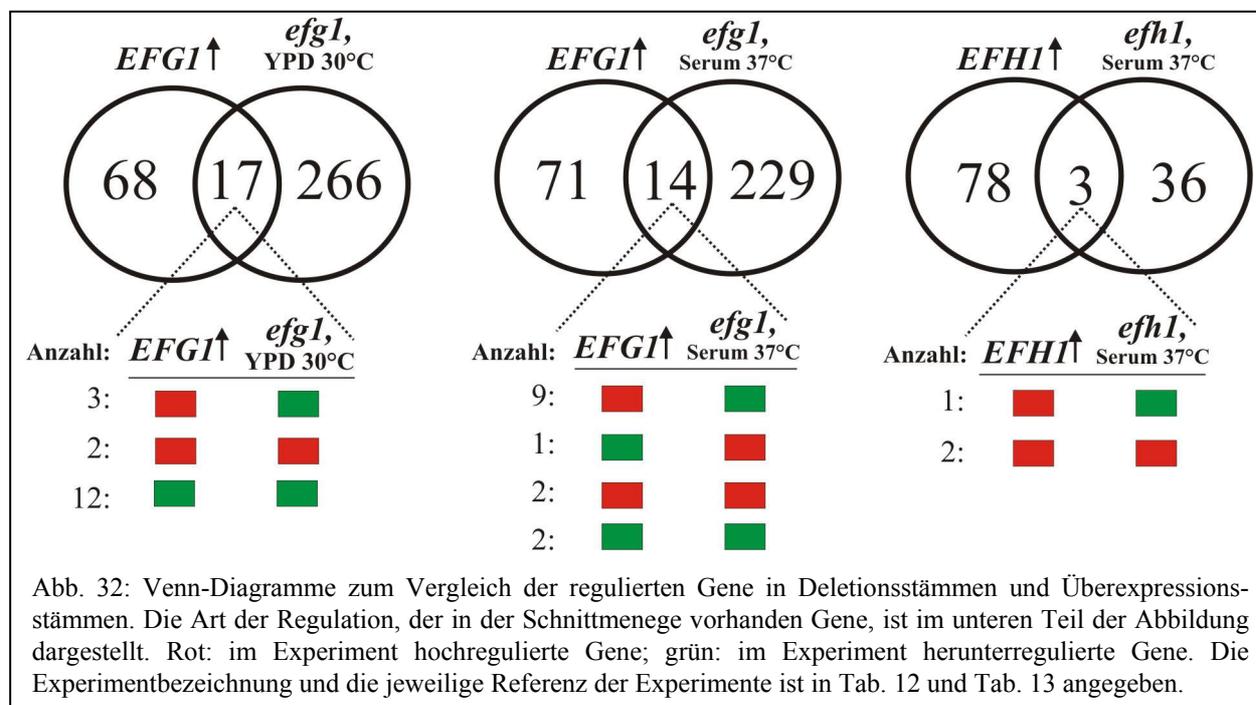


Überexpression von *EFHI* führte zu 81 differentiell exprimierten Genen (Tab. 22), von denen 53 höher und 28 niedriger exprimiert wurden als die Referenz. Die Tatsache, dass unter den hochregulierten Genen *EFHI* selbst zu finden ist, deutet auf die Zuverlässigkeit der Daten. Neben *HWPI* und *ECE1*, sind mit *HYR1*, *ALS10*, *SEC24* und *IPF10662* (*IHD1*) vier weitere Gene bei *EFHI*-Überexpression induziert, die ebenfalls bei der Hypheninduktion aktiviert werden (Bailey *et al.*, 1996; Nantel *et al.*, 2002). Neben diesen hyphenspezifischen Genen sind einige metabolische Gene (z.B. *ADH5*, *ACS2* und *PFK2*) sowie zwei für die Stressantwort kodierende Gene (*SOD22*, *YHB1*) aktiviert. Das für ein Zellwandprotein kodierende Gen *IPF5185* wird bei Überexpression von *EFHI* geringer exprimiert. Nantel *et al.* (2002) konnten zeigen, dass dieses Gen, welches aufgrund der Homologie zu *S. cerevisiae* als *FLO1* bezeichnet wurde, ebenfalls bei Hypheninduktion geringer exprimiert wird. Unter den herunterregulierten Genen ist vor allen eine Gruppe von Genen zu nennen, welche für Transporter und Permeasen kodiert. Hierzu gehören *HGT11*, *HGT12*, *JEN1*, *JEN2*, *IPF4181* sowie *IPF7493*.

Der Vergleich der statistisch regulierten Gene beider Überexpressionsexperimente, führt zu einer Anzahl von acht gleich-regulierten Genen. So ist die Expression von *HWPI*, *ALS10*, *ECE1*, *ACS1*, *ADH5*, *MET6* und *IPF15604* in beiden Überexpressionsstämmen hochreguliert und die Expression von *IPF7493* in beiden Stämmen geringer als in der Referenz. Die Abb. 30 zeigt eine Clusteranalyse aller Gene, die in mindestens einem der beiden Experimente eine 1,5-fache statistische Abweichung von der Referenz zeigten. Bei Vergrößerung der Subcluster A1, A2 und B fällt auf, dass neben den oben genannten Genen einige weitere Gene tendenziell gleich reguliert sind. Der Grund, dass diese Gene nicht in beiden Genlisten zu finden sind ist, dass in der Clusteranalyse lediglich die Mittelwerte aller Replikate eines Experimentes abgebildet sind und keine Aussage über die Signifikanz der Ergebnisse gemacht wird. Obwohl aufgrund der stringenten Statistik einige dieser Gene herausgefiltert wurden, lassen sich durch die Clusteranalyse zumindest Anhaltspunkte auf die Regulation erkennen. Auffallend ist, dass im Subcluster A drei Gene des Methionin-Stoffwechsels (*MET6*, *MET13*, *MET15*) sowie einige andere in den Metabolismus involvierte Gene (*ACS1*, *ACS2*, *ADH5*) zu finden sind. In den herunterregulierten Genen (Subcluster B: Abb. 31) sind besonders die Gene *HGT11*, *HGT12* und *STL1* zu erwähnen. Alle drei Gene kodieren für Zucker-Transporter. Viele der Gene, deren Expression während der Hypheninduktion variiert, werden auch bei Überexpression von

*EFG1* und *EFH1* beeinflusst. So werden in beiden Überexpressionsexperimenten die bei Hypheninduktion aktivierten Gene *HWP1*, *DDR48*, *ECE1* und *IDH1* hochreguliert und die bei Hypheninduktion reprimierten Gene *FLO1* (*IPF5185*) und *CMK1* inaktiviert.

Beim Vergleich der Gene, die unter Überexpressionsbedingungen reguliert werden, mit Genen, die in der entsprechenden Nullmutante beeinflusst werden, fällt auf, dass nur wenige Gene unter beiden Bedingungen reguliert werden (Abb. 32).

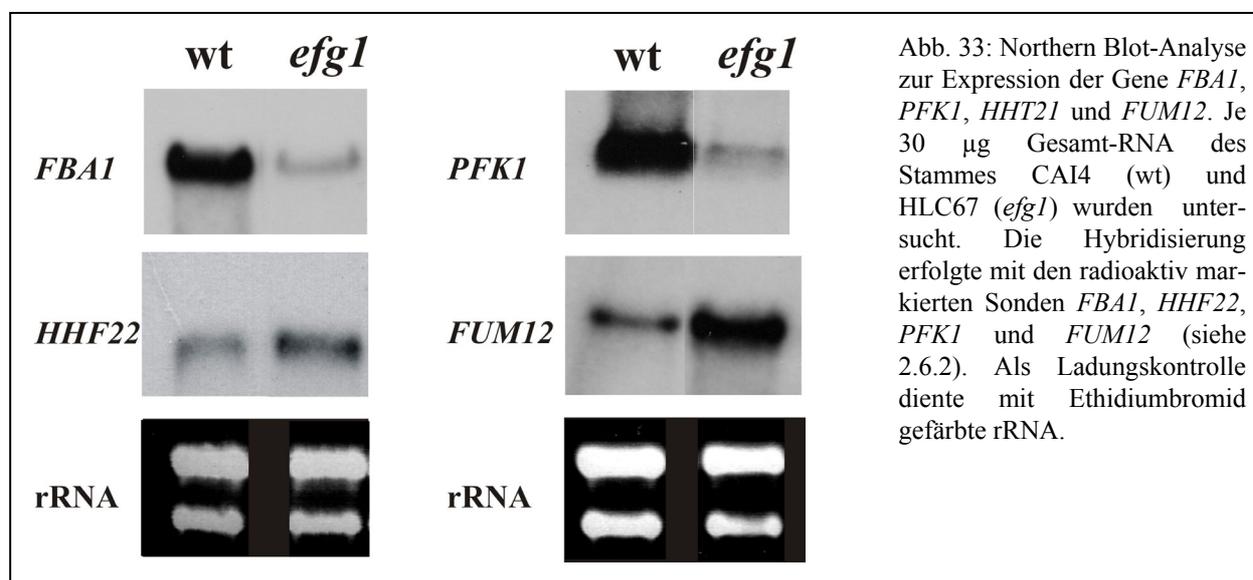


Des Weiteren fällt auf, dass unter diesen Genen einige gleich und andere entgegengesetzt reguliert werden. So sind beim Vergleich der regulierten Gene aus dem *EFG1*-Überexpressionsexperiment mit denen der *efg1*-Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen zehn Gene (*FBA1*, *DDR48*, *RIB7*, *HWP1*, *ADH5*, *IFE2*, *FET34*, *IPF5198*, *ALS10* und *IPF19195*) entgegengesetzt reguliert, während bei dem Vergleich mit nicht-hypheninduzierenden Bedingungen nur drei Gene (*FBA1*, *IFE2* und *IPF4450*) entgegengesetzt reguliert werden. Eine entgegengesetzte Regulation bei der Überexpression und der Mutante deutet auf einen ähnlichen Mechanismus der Regulation durch Efg1p bzw. Efh1p. Gene, welche beispielsweise durch Efg1p aktiviert werden, sind in der Mutante herunterreguliert und bei Überexpression hochreguliert.

Bei dem Vergleich der regulierten Gene bei *EFH1*-Überexpression, mit denen der *efh1*-Mutante zeigte sich lediglich unter hypheninduzierenden Bedingungen eine Schnittmenge von drei Genen. Hierbei ist nur das Gen *STF2*, welches für ein regulatorisches Protein der ATP-Synthase kodiert, entgegengesetzt reguliert.

### 3.9 Northern Blot-Analyse der *FBA1*, *PFK1*, *FUM12* und *HHT21*-Expression

Um die Ergebnisse der DNA-Microarrays zu bestätigen, wurde mit Hilfe von Northern Blot-Analysen die Expression einiger Efg1p-regulierter Gene untersucht. Die Efg1p abhängige Expression einiger in dieser Arbeit identifizierter Gene konnte bereits in anderen Arbeiten durch Northernanalysen gezeigt werden. Hierzu gehören z. B. *FLO1* (*IPF5185*), *HSP12* und *HWP1* (Sohn *et al.*, 2002; Lane *et al.*, 2001). Da insbesondere die Efg1p-vermittelte Regulation von Genen, die für Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus kodieren, nicht bekannt war, wurden zur Verifizierung der Microarray-Ergebnisse hauptsächlich metabolische Gene gewählt. Die Expression von zwei durch Efg1p aktivierten glykolytischen Genen (*FBA1* und *PFK1*) sowie von zwei durch Efg1p reprimierten Genen (*FUM12* und *HHT22*) wurde durch Northern Blot-Analysen überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 dargestellt.



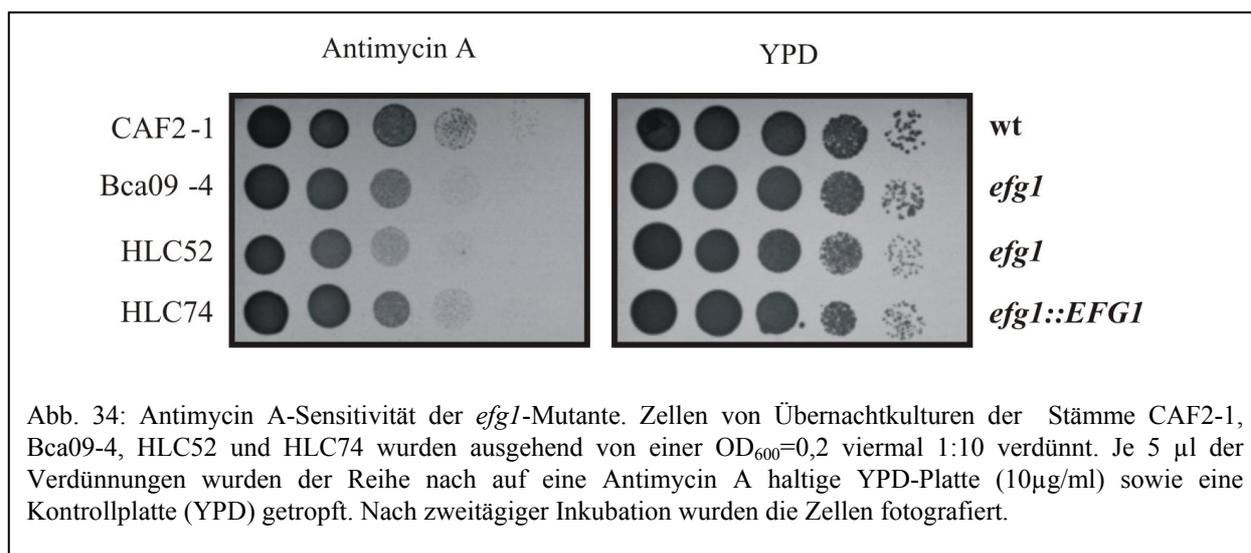
Die Expression von *FBA1* und *PFK1* ist im Wildtyp-Stamm deutlich stärker als in der *efg1*-Mutante. Die Gene *FUM12* und *HHT22* sind hingegen in der *efg1*-Mutante stärker exprimiert als im Wildtyp. Eine Färbung der ribosomalen RNA mit Ethidiumbromid zeigt, dass in beiden Spuren die gleiche Menge an RNA aufgetragen wurde. Auffällig ist, dass die Expressionsunterschiede, vor allem für die Gene *FBA1* und *PFK1* in der Northern Blot-Analyse deutlicher sind, als bei der Microarray-Analyse. Während in der Microarray-Analyse eine 2,7-fach (*FBA1*) bzw. 2,2-fach (*PFK1*) stärkere Expression im Wildtyp ermittelt wurde (siehe Anhang: Tab. 15), sind die Unterschiede in der Northern Blot-Analyse deutlich stärker. Bei den Efg1p-reprimierten Genen *HHT22* und *FUM12* sind die Expressionsunterschiede in den beiden Experimenten etwa gleich. Die Ergebnisse der DNA-Microarrays konnten somit bestätigt werden.

### 3.10 Antimycin A – Sensitivität der *efg1*-Mutante

In Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass nahezu jedes Gen, welches für ein glykolytisches Enzym kodiert, in der *efg1*-Mutante geringer exprimiert wird als im Wildtyp-Stamm (siehe 3.8.1.1). Dies lässt darauf schließen dass Efg1p direkt oder indirekt über andere

Proteine die Genexpression dieser Gene aktiviert. Die Glykolyse bezeichnet den cytoplasmatischen Abbau von Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat, bei der netto pro Molekül Glukose zwei Moleküle ATP sowie zwei Moleküle  $\text{NADH}+\text{H}^+$  gebildet werden. Das gebildete Pyruvat wird unter normalen Umständen in den Citrat-Zyklus weitergeleitet. Bei diesem in der Mitochondrienmatrix stattfindendem Prozess wird das Pyruvat zunächst decarboxyliert und nach Bindung an das Coenzym A, als Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust. Bei diesem Kreislauf entstehen neben zwei Molekülen  $\text{CO}_2$  pro eingeschleustem Acetyl-CoA drei Moleküle  $\text{NADH}+\text{H}^+$  sowie ein Molekül  $\text{FADH}+\text{H}^+$ . Diese reduzierten Coenzyme übertragen letztendlich den Wasserstoff schrittweise auf molekularen Sauerstoff. Während dieses Prozesses, der als Atmungskettenphosphorylierung bezeichnet wird, werden pro reduzierten Coenzym drei Moleküle ATP gebildet. Die Glykolyse ist somit von entscheidender Bedeutung für den Abbau von Glukose, liefert energetisch gesehen aber nur einen geringen Beitrag (Glykolyse: zwei Moleküle ATP, Atmungskette: 32 Moleküle ATP).

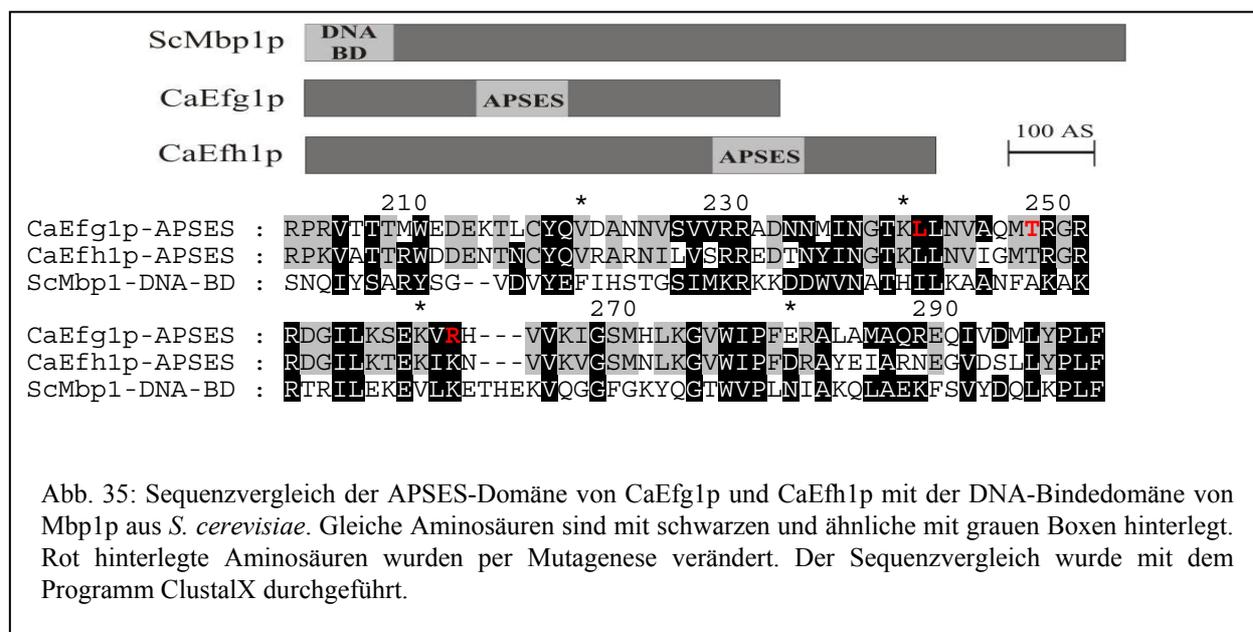
Unter normalen Bedingungen sind keine Unterschiede bezüglich der Wachstumsrate von *efg1*-Mutanten und dem Wildtyp zu erkennen (siehe Abb. 34). Da der Großteil der gewonnenen Energie nicht aus der Glykolyse sondern aus der Atmungskette stammt, ist es denkbar, dass die *efg1*-Mutante die reduzierte glykolytische Aktivität durch eine gesteigerte Atmungskettenphosphorylierung kompensiert. Unterstützt wird diese Theorie durch die Aktivierung einiger für die Respiration nötigen Gene (siehe 3.8.1.1). Durch Inhibierung der Atmungskette mit der Substanz Antimycin A sollte die reduzierte glykolytische Aktivität der *efg1*-Mutante nachgewiesen werden. Antimycin A inhibiert den Atmungskomplex III und verhindert somit den Elektronentransport. Es wurden definierte Zellzahlen aus Übernachtskulturen des Wildtyps, zweier unabhängiger *efg1*-Mutanten sowie einer *efg1*-Revertante auf eine Antimycin A haltige YPD-Agarplatte (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) getropft. Zur Kontrolle wurden die gleichen Zellzahlen auf eine Agarplatte ohne Antimycin getropft. Das Ergebnis ist in Abb. 34 zu sehen. Während auf der Kontrollplatte kein Unterschied im Wachstum zu sehen ist, zeigen die beiden unabhängigen *efg1*-Deletionsstämme einen Wachstumsdefekt in Anwesenheit von Antimycin A. Bei dem Stamm HLC52 ist diese Sensitivität etwas stärker ausgeprägt als bei dem Stamm Bca09-4. Der Stamm HLC74, der durch Reintegration eines *EFG1*-Allels aus dem Stamm HLC52 hervorgegangen ist (Lo *et al.*, 1997), ist wiederum weniger sensitiv als die Volldisruptante. Die reduzierte glykolytische Aktivität der *efg1*-Mutante konnte somit bestätigt werden.



Drei weitere in den Kohlenstoffmetabolismus involvierte Gene (*ADH1*, *ADH4* und *PDC11*), die in der *efg1*-Mutante geringer exprimiert wurden, kodieren für zwei Alkoholdehydrogenasen sowie die Pyruvatdecarboxylase. Diese Proteine sind die Schlüsselenzyme in der alkoholischen Gärung. Hierbei wird das bei der Glykolyse gebildete Pyruvat nicht in den Citratzyklus weitergeleitet, sondern durch Decarboxylierung in Acetaldehyd umgewandelt. Dieser wird durch in der Glykolyse gebildetes  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu Ethanol reduziert. Mit Hilfe eines kommerziellen Enzymgekoppelten Assays (Ethanol, Roche) wurde die Ethanolproduktion der *efg1*-Mutanten mit der des Wildtyps verglichen werden. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl die *efg1*-Mutante, als auch die *efg1/efh1*-Doppelmutante die gleiche Ethanolproduktion wie der Wildtyp zeigten (Daten nicht gezeigt).

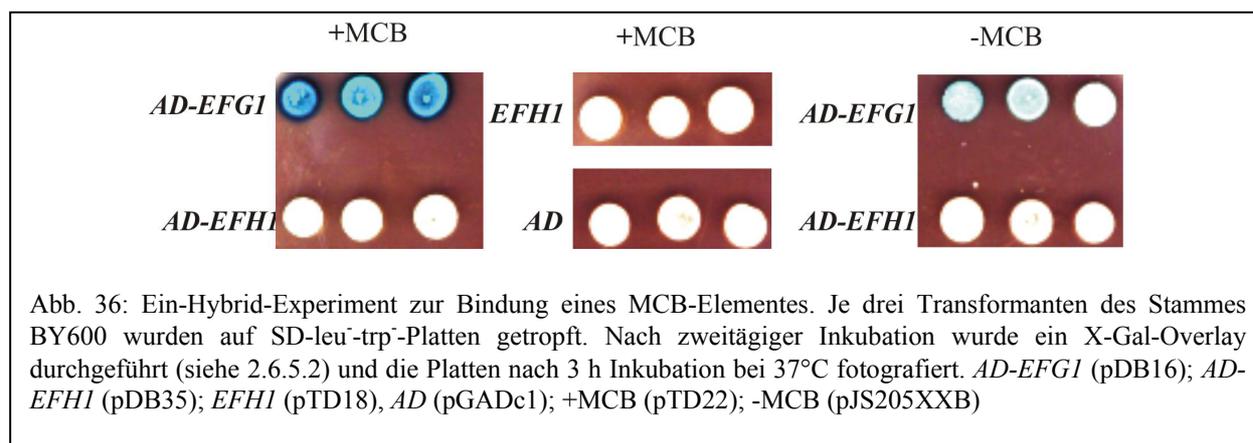
### 3.11 Bindung von Efg1p an MCB-Elemente

Efg1p und Efh1p gehören zur einer Proteinfamilie, welche als APSES-Proteine bezeichnet werden. Die sieben bisher charakterisierten Mitglieder kodieren für Transkriptionsfaktoren und sind alle an der Regulation morphologischer Prozesse von verschiedenen Pilzen beteiligt. Im Zentrum des homologen Bereichs dieser Proteine befindet sich ein typisches Motiv für Transkriptionsfaktoren, eine so genannte bHLH-Domäne (basic Helix-Loop-Helix). Obwohl viele bHLH-Proteine die DNA über eine so genannte E-Box (CANNTG) binden, konnte lediglich *in vitro* eine Bindung von Efg1p an diese Sequenz nachgewiesen werden (Leng *et al.*, 2001). Neben der hohen Homologie zu den anderen APSES-Proteinen zeigen der APSES-Bereich von Efg1p und Efh1p ebenfalls eine Homologie zur DNA-Binde-Domäne des Transkriptionsfaktors Mbp1p aus *S. cerevisiae* (Abb. 35).



Der Transkriptionsfaktor Mbp1p ist an der Zellzyklus-spezifischen Expression vieler DNA-Synthese- und Reparatur-Gene beteiligt. Hierbei bildet er zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Swi6p den so genannten MBF-Komplex (MCB-binding-factor), welcher an eine 6 bp-lange palindromische Sequenz (ACGCGT) bindet, die als „*MluI*-Cell-Cycle-Box“ (MCB) bezeichnet wird (McIntosh *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 1993). Ein-Hybrid-Experimente haben

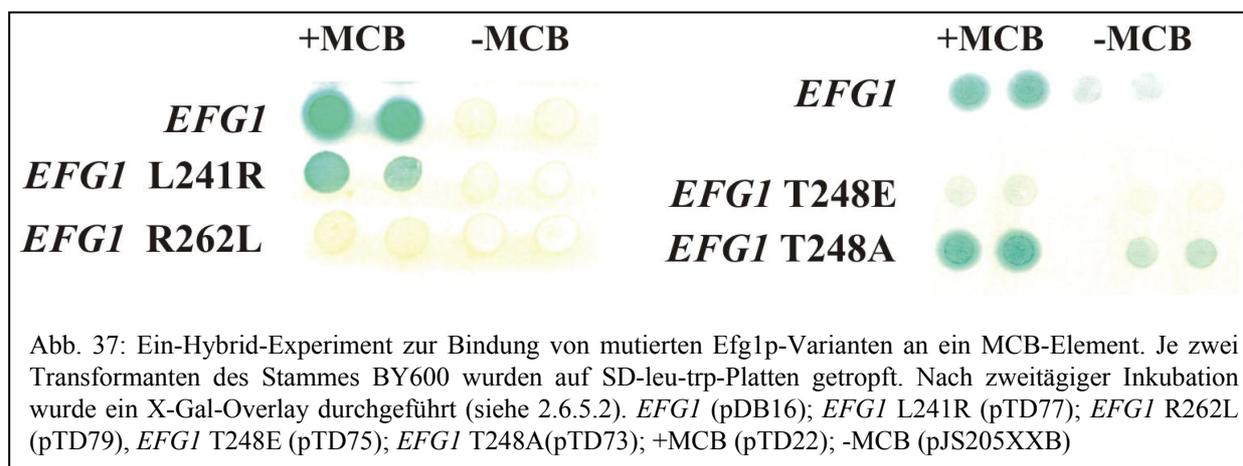
gezeigt, dass Efg1p ebenfalls in der Lage ist *in vivo* an eine dreifache Kopie dieses MCB-Elementes zu binden (Doedt, 2000). In einem Ein-Hybrid-Experiment wird die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Promotor-Bindung eines Proteins, welches an die Aktivierungsdomäne des Gal4-Aktivators fusioniert ist, aktiviert. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Efg1p und auch Efh1p an eine einfache Kopie dieser DNA-Sequenz binden. Hierzu wurden die am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotide 1xMCB-PhH, a und 1xMCB-Ph, b hybridisiert und anschließend in die *Xho*I-Schnittstelle des Vektor pJS205XXB (*CYC1p-lacZ*) kloniert. Das so klonierte Reporterplasmid (pTD22) sowie der Leervektor pJS205XXB wurden zusammen mit dem Vektoren pDB16 (*ADH1p-GAL4AD-EFG1*), pDB35 (*ADH1p-GAL4AD-EFH1*) oder pTD18 (*ADH1p-EFH1*) in den *S. cerevisiae*-Stamm BY600 transformiert. Dieser Stamm trägt eine Deletion des *swi6*-Gens, um eine Bindung des MBF-Faktors an das MCB-Element zu verhindern. Die Ergebnisse des Ein-Hybrid-Experiments sind in Abb. 36 dargestellt. Anhand der Blaufärbung ist deutlich zu erkennen, dass Efg1p an das MCB-Element binden kann. Efh1p hingegen kann, trotz der ebenfalls hohen Homologie zu Mbp1p, weder allein, noch als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase über Bindung des MCB-Elementes aktivieren.



Im weiteren Verlauf sollte der Einfluss vier spezifischer Aminosäureaustausche im Efg1p-Protein auf die Bindung des MCB-Elementes untersucht werden. Die ausgetauschten Aminosäuren sind in Abb. 35 rot markiert. Es handelt sich hierbei um einen Austausch des Lysins in Position 241 zu Arginin (L241R), des Arginins in Position 262 zu Lysin (R262L) sowie um einen Austausch des Threonins in Position 248 zu Glutamat (T248E) bzw. Alanin (T248A). Für alle vier Aminosäureaustausche konnte gezeigt werden, dass sie für die Funktion von Efg1p essentiell sind (Bockmühl, 2000). Die mutierten Versionen von Efg1p waren nicht in der Lage den Hyphendefekt des *efg1*-Deletionsstammes zu komplementieren. Zur Erläuterung dieser Austausche muss die Homologie der APSES-Proteine zu bekannten bHLH-Proteinen wie *myc*, *max* und *myoD* in Betracht gezogen werden (Ferre-d'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994). Bei Position 241 befindet sich in allen APSES-Proteinen ein Leucin, während die anderen bHLH-Proteine an dieser Stelle ein Arginin besitzen. Die Position 262 zeigt die umgekehrte Situation. Hier ist in allen APSES-Proteinen bis auf Efh1p ein Arginin und in den bHLH-Proteinen ein Leucin zu finden. Bei Efh1p befindet sich an dieser Position die zu Arginin sehr ähnliche Aminosäure Lysin. An Position 248 weisen alle APSES-Proteine einen Threonin-Rest auf, die bHLH-Proteine hingegen einen Glutamat-Rest.

Um zu überprüfen ob diese Aminosäuren ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der DNA-Bindung von Efg1p spielen, wurden mit Hilfe einer PCR-Mutagenese die Nukleotidsequenz des Vektors pDB16 (*ADHI-GAL4AD-EFG1*) gezielt modifiziert (siehe 2.5.9.3). Die Mutagenese wurde durch eine Teilsequenzierung des Vektors überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die Bindung dieser mutierten Efg1p-Versionen an ein MCB-Element und daraufhin folgende Aktivierung der *lacZ*-Expression ist in Abb. 37 zu sehen.



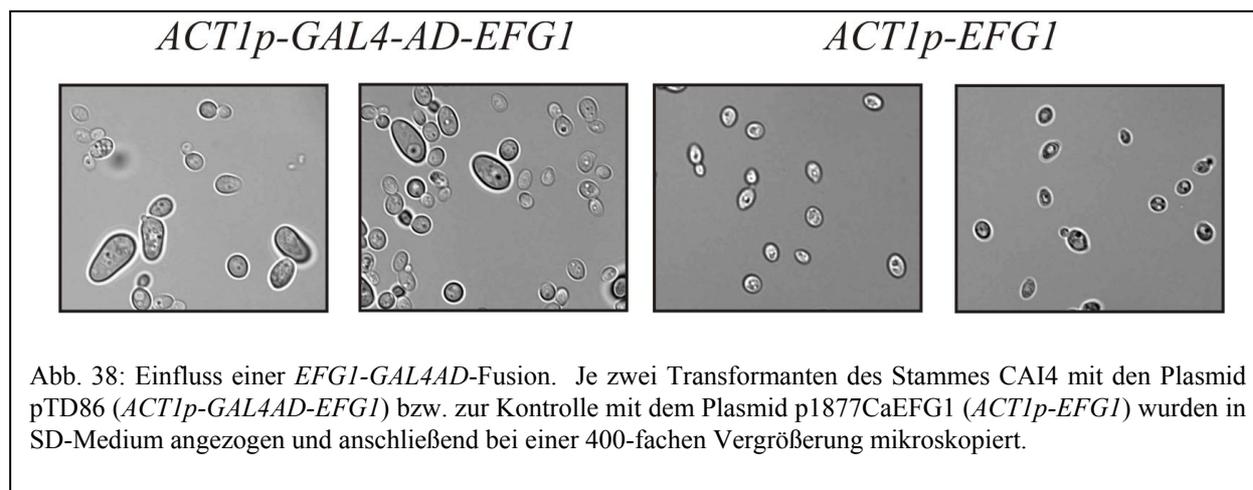
Die Austausche L241R und T248A zeigen eine deutliche Blaufärbung im ähnlichen Maße wie unverändertes Efg1p. Bei den Austauschen R262L und T248E hingegen ist keine Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression, und somit keine DNA-Bindung zu erkennen.

In *C. albicans* konnte bisher erst ein Gen identifiziert werden, welches zumindest bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* über ein MCB-Element reguliert wird. Dieses Gen (*DUTI*) kodiert für eine dUTP-Pyrophosphatase und verhindert durch Hydrolyse den Einbau von UTP in die DNA (Mc Intosh *et al.*, 1994; Gadsden *et al.*, 1993). Um zu überprüfen, ob die Expression dieses Gens möglicherweise durch Efg1p reguliert wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit Northern-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass weder die Deletion noch eine Überexpression von *EFG1* die Expression von *DUTI* verändert (Daten nicht gezeigt) und somit Efg1p nicht an der Regulation der *DUTI*-Expression beteiligt ist.

### 3.12 Einfluss einer *EFG1*-Fusion an die Gal4p-Aktivierungsdomäne

In Ein-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Efg1p in der Lage ist, an ein MCB-Element zu binden (siehe 3.11). Die Aktivierung des Reportergens *lacZ* erfolgte allerdings nur, wenn Efg1p an die Aktivierungsdomäne des Gal4p-Transkriptionsfaktors fusioniert wurde. In parallelen Studien konnte ebenfalls durch Ein-Hybrid-Experimente gezeigt werden, dass eine Efg1p-LexA-Fusion in *C. albicans* die Transkription eines Reportergens unter Kontrolle der *lexA*-Bindestelle reprimiert (Russel, pers. Mitteilung). So übernimmt Efg1p *in vivo* zumindest unter manchen Bedingungen die Rolle eines Transkriptionsrepressors. Durch die Fusion von Efg1p an die Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsaktivators sollte überprüft werden, ob so möglicherweise die reguläre Funktion von Efg1p gestört werden kann. Hierzu wurde die *EFG1-GAL4AD*-Fusion unter die Kontrolle des konstitutiven *ACT1*-Promotors kloniert. Das

erhaltene Plasmid pTD86 wurde zusammen mit einer Kontrolle (*ACT1p-EFG1*) in den Wildtyp-Stamm (CAI4) transformiert und die Zellen anschließend mikroskopiert. Wie in Abb. 38 zu sehen, zeigen die Zellen, welche die *EFG1-GAL4AD*-Fusion exprimieren, eine stark veränderte Zellmorphologie. So sind einige Zellen bis auf das Vielfache ihrer normalen Größe gewachsen und bilden bis zu fünffach größere keulenartige Zellformen. Die Tatsache, dass nicht alle Zellen diesen Phänotyp zeigen, ist vermutlich auf die Kopienzahl des Plasmid zurückzuführen, die von Zelle zu Zelle variieren kann. Dieses Ergebnis zeigt, dass Efg1p als Transkriptionsaktivator seine normale Funktion bei der Morphogenese verliert.



### 3.13 Regulation des *FLO1* (*IPF5185*) –Promotors

Studien aus Ein-Hybrid-Experimenten haben gezeigt, dass Efg1p in der Lage ist, *in vivo* an eine 6 bp-lange palindromische Sequenz (ACGCGT) zu binden, die als „*MluI*-Cell-Cycle-Box“ (MCB) bezeichnet wird (siehe Abschnitt 3.11; Doedt, 2000). Diese Erkennungssequenz spielt in *S. cerevisiae* eine große Rolle bei der Expression von Zellzyklus-regulierten Genen. Sie wird erkannt durch den so genannten MBF-Komplex, der aus den beiden Proteinen Mbp1p und Swi6p besteht (McIntosh *et al.*, 1991; Verma *et al.*, 1991). Bei der Analyse der Promotorbereiche, der in der *efg1*-Mutante regulierten Gene (siehe 3.8.1.1) fällt auf, dass bei den drei am stärksten durch Efg1p aktivierten Genen (*IPF14540*, *RNR22* und *IPF5185*) jeweils ein MCB-Element zu finden ist. *IPF14540* kodiert für ein mögliches „Multidrug“-Resistenzprotein, *RNR22* für eine Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase und *IPF5185* für ein Zellwandprotein. Um zum einen die Efg1p abhängige Regulation des Microarray-Experiments zu bestätigen, und zum anderen, um zu überprüfen, ob die Expression dieser Gene über Bindung des MCB-Elementes reguliert wird, sollte der Promotor des *IPF5185*-Gens exemplarisch mit Hilfe einer Fusion an ein Reporter-gen untersucht werden. Das bisher uncharakterisierte Gen *IPF5185* kodiert für ein Protein, welches eine hohe Homologie zu dem Zellwandprotein Flo1p aus *S. cerevisiae* zeigt. Dieses O-glykosylierte Protein ist an der Knospenspitze lokalisiert und an der Zellaggregation sowie der Zelladhäsion von *S. cerevisiae* beteiligt (Watari *et al.*, 1994). Nantel *et al.* (2002) und Sohn *et al.* (2003) bezeichneten das Gen als *FLO1* bzw. *YWPI* („yeast wall protein“) und konnten zeigen, dass dieses Gen nach Hypheninduktion reprimiert wird. Aufgrund der Homologie wird das Gen *IPF5185* im Folgenden als *FLO1* bezeichnet. Zur Analyse des Promotors wurde eine 1891-bp

große Region distal vor dem ATG per PCR amplifiziert und vor das Reporter-gen *RLUC* kloniert. Das *RLUC*-Gen kodiert für eine Luziferase, deren Aktivität mittels einer Lumineszenz-Messung leicht gemessen werden kann (siehe 2.6.5.4). Um den Einfluss des MCB-Elementes zu überprüfen, wurde die 6 bp-lange Nukleotidsequenz durch eine PCR-Mutagenese deletiert (siehe 2.5.9.3), wodurch das Plasmid pTD81 entstand. Die Deletion wurde durch eine Teilsequenzierung des Plasmides überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Plasmide, welche keine autonom replizierende Sequenz (*ARS*) tragen, wurden zur Integration in den *FLO1*-Locus mit dem Restriktionsenzym *Bst1107I* linearisiert, und in den Wildtyp und *efg1*-Deletionsstamm transformiert. Die korrekte Integration des Fragmentes wurde per PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt). Je drei isogene Stämme wurden daraufhin in verschiedenen Medien angezogen, und die Luziferase-Aktivität (bezogen auf den Gesamt-Proteingehalt) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 39 zu sehen.

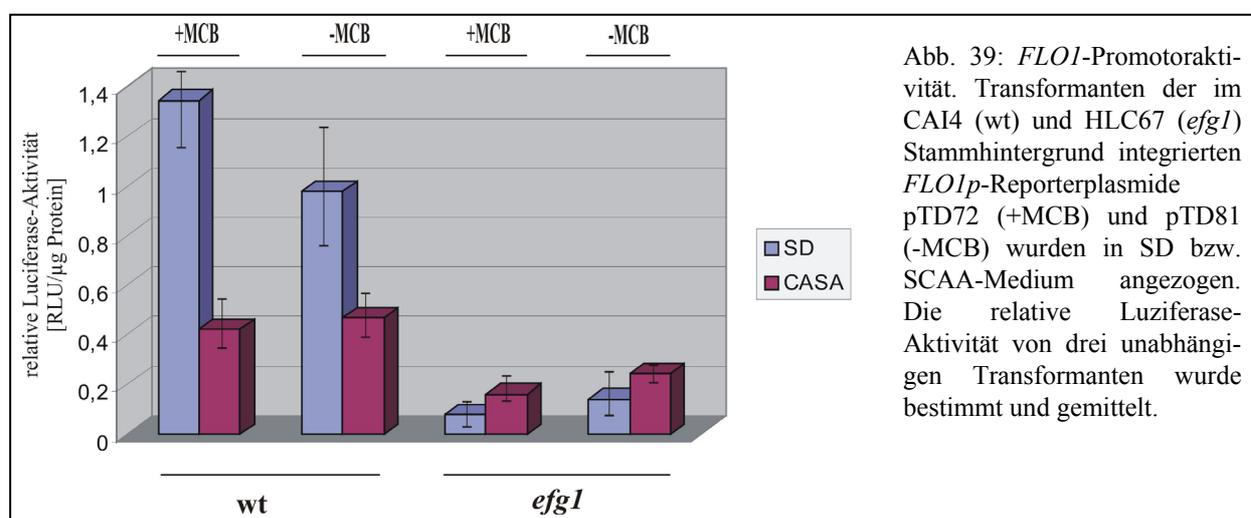


Abb. 39: *FLO1*-Promotoraktivität. Transformanten der im CAI4 (wt) und HLC67 (*efg1*) Stammhintergrund integrierten *FLO1p*-Reporterplasmide pTD72 (+MCB) und pTD81 (-MCB) wurden in SD bzw. SCAA-Medium angezogen. Die relative Luziferase-Aktivität von drei unabhängigen Transformanten wurde bestimmt und gemittelt.

Im *efg1*-Stammhintergrund zeigt der *FLO1*-Promotor eine deutlich reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Stammhintergrund. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Microarray-Experimenten. Des Weiteren zeigt sich, dass die Deletion des MCB-Elementes innerhalb des Promotors keinen Einfluss auf die Aktivität hat. Sowohl im Wildtyp-, als auch im *efg1*-Stammhintergrund konnten mit und ohne dieser 6 bp langen Erkennungssequenz keine Unterschiede gemessen werden. Auffällig ist weiterhin, dass die Aktivität des *FLO1*-Promotors stark abhängig von der Kohlenstoffquelle ist. So konnte bei Wachstum auf glukosehaltigen Medien im Wildtyp-Stammhintergrund eine etwa doppelt so starke Aktivität wie beim Wachstum auf glukosefreien Medien (SCAA) bestimmt werden. Im *efg1*-Hintergrund hingegen verhält es sich genau umgekehrt. Diese Stämme zeigen eine leicht erhöhte Aktivität bei Wachstum in glukosefreiem SCAA-Medium (siehe Abb. 39).

Um den Bereich einzuengen, der für die Efg1p abhängige Expression verantwortlich ist, wurden durch PCR-Mutagenese Deletionen in das Reporterkonstrukt eingeführt. Die Lage der Deletionen ist in Abb. 40 schematisch dargestellt. Nach Überprüfung der Deletionen durch Restriktionsanalyse, wurden die erhaltenen Plasmide pTD82 (Deletion1), pTD83 (Deletion2), pTD84 (Deletion3) und pTD85 (Deletion4) zur Integration mit dem Restriktionsenzym *Bst1107I* linearisiert und dann in die den Wildtyp-Stamm (CAI4) sowie den *efg1*-Deletionsstamm (HLC67) transformiert. Die Luziferase-Aktivität der in SD sowie SCAA-Medium angezogenen Stämme ist in der Abb. 41 dargestellt.

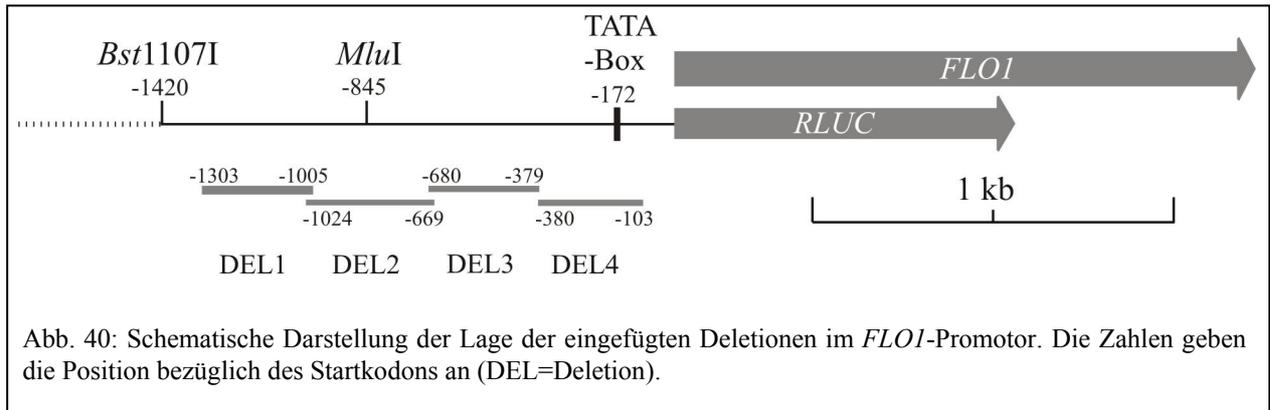


Abb. 40: Schematische Darstellung der Lage der eingefügten Deletionen im *FLO1*-Promotor. Die Zahlen geben die Position bezüglich des Startkodons an (DEL=Deletion).

In der Abb. 41 wird deutlich, dass keine der vier Deletionen des *FLO1*-Promotors dessen Regulation erheblich beeinflussen. Zwar ist bei der Deletion 3 und Deletion 4 die Gesamtaktivität deutlich reduziert, allerdings ist auch hier die Glukose abhängige Regulation sowie die reduzierte Aktivität im *efg1*-Deletionsstamm zu beobachten. Die DNA-Sequenzen, die an der Efg1p-spezifischen Regulation beteiligt sind, müssen demnach stromaufwärts von der Deletion 1 liegen. In parallelen Ansätzen sollte versucht werden, mit Hilfe der Chromatin-immunpräzipitation eine direkte Bindung von Efg1p an den *FLO1*-Promoter zu zeigen. Hierzu wurden die Primer 5185p(180)hin und 5185p(180)her verwendet, welche ein 180 bp großes Fragment einschließlich des MCB-Elementes amplifizieren. Eine Bindung an den Promotor konnte allerdings nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte einerseits daran liegen, dass der Promotor nur indirekt über Efg1p reguliert wird, oder daran, dass die DNA-Bindung in einer von der *Mlu*I-Schnittstelle entfernten Region stattfindet.

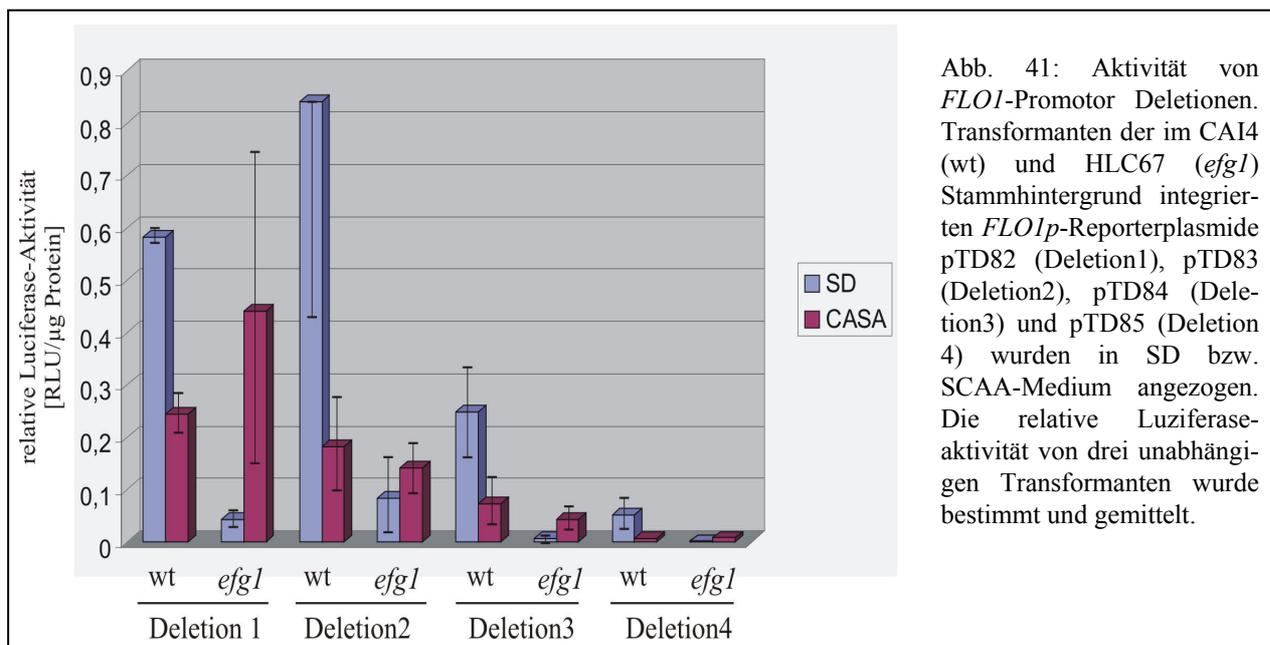
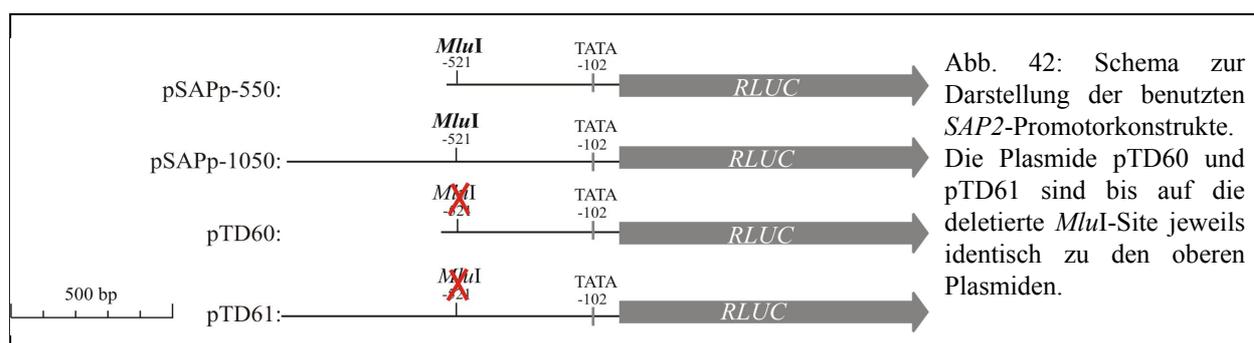


Abb. 41: Aktivität von *FLO1*-Promotor Deletionen. Transformanten der im CAI4 (wt) und HLC67 (*efg1*) Stammhintergrund integrieren *FLO1p*-Reporterplasmide pTD82 (Deletion1), pTD83 (Deletion2), pTD84 (Deletion3) und pTD85 (Deletion4) wurden in SD bzw. SCAA-Medium angezogen. Die relative Luziferaseaktivität von drei unabhängigen Transformanten wurde bestimmt und gemittelt.

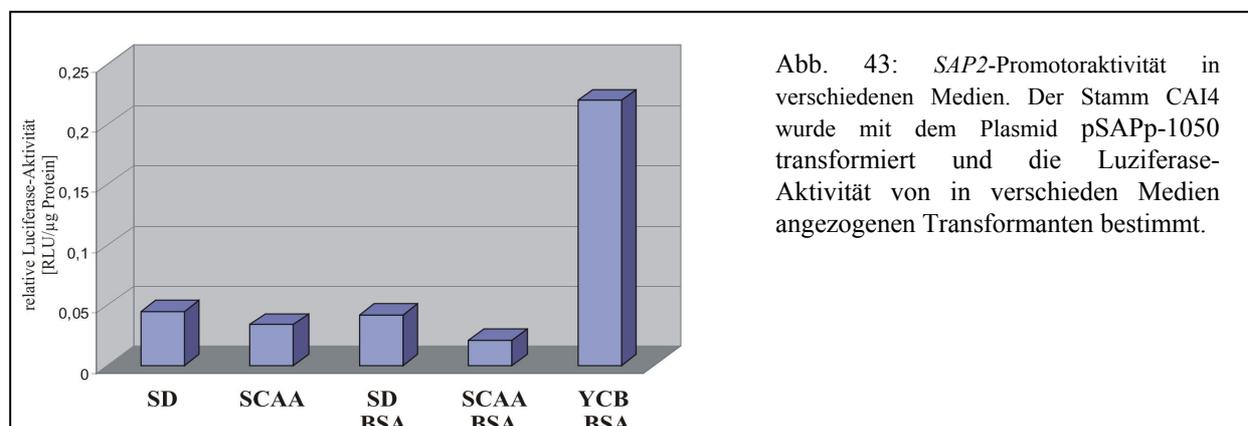
### 3.14 Regulation des *SAP2*-Promotors

Die Sekretion von sauren Aspartatproteasen ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* (Hube *et al.*, 1997). Die Expression der meisten dieser aus 10 Mitgliedern bestehenden Genfamilie wird während der Hypheninduktion induziert (Chen *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2001). Während die Gene *SAP4* und *SAP6* in einer *efg1*-Mutante geringer exprimiert werden als im Wildtyp (Felk *et al.*, 2002), gibt es Hinweise, dass das *SAP2*-Gen durch Efg1p reprimiert wird (siehe 3.8.2, Morschhäuser, pers. Mitteilung). Bei der Analyse des *SAP2*-Promotors stellte sich heraus, dass etwa 500 bp vor dem Startkodon ein MCB-Element vorhanden ist. Um zu überprüfen, ob der *SAP2*-Promotor durch Efg1p reprimiert wird, womöglich sogar über Bindung des MCB-Elementes, wurden Fusionen des *SAP2*-Promotors mit dem Luziferase-Gen genutzt. Es wurden zwei unterschiedlich lange Promotorfusionen verwendet (siehe Abb. 42).

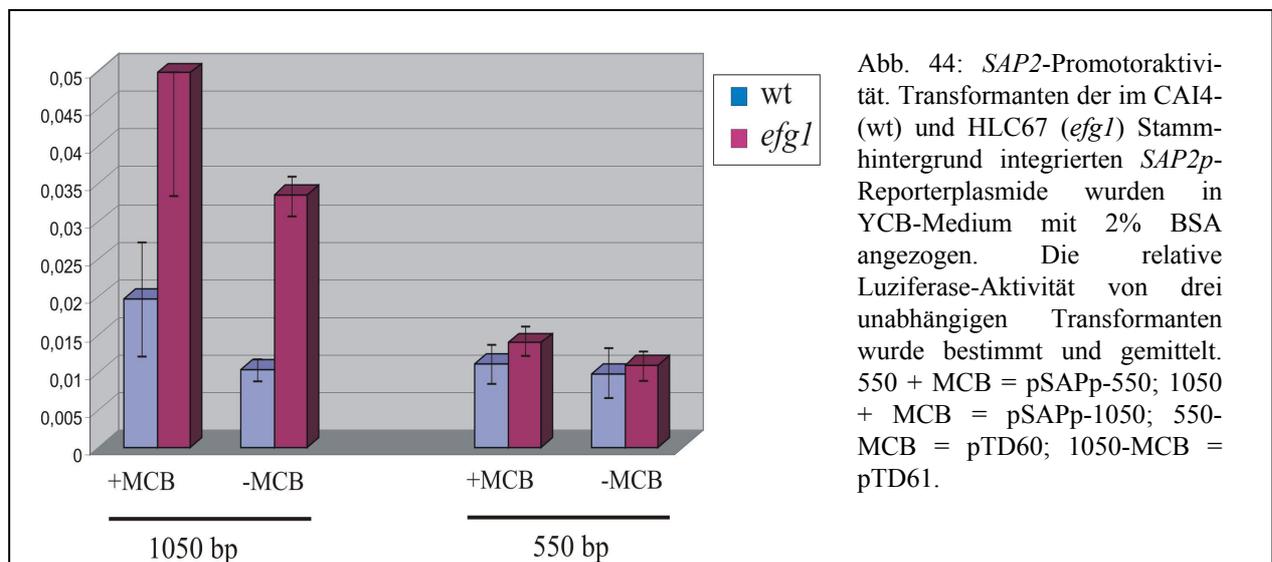


Um den Einfluss des MCB-Elementes zu überprüfen, wurde die *MluI*-Schnittstelle in beiden Promoterfusionen durch eine PCR-Mutagenese (2.5.9.3) deletiert. Die erfolgreiche Mutagenese, die zu den Plasmiden pTD60 und pTD61 führte, wurde durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym *MluI* verifiziert. Um den Einfluss unterschiedlicher Kopienzahl der Plasmide zu verhindern, wurde die Reporterplasmide in den *RP10*-Lokus integriert. Hierzu wurden die Plasmide innerhalb des auf den Plasmiden vorhandenen *RP10*-Gens mit dem Restriktionsenzym *NcoI* linearisiert, und anschließend in den Wildtyp (CAI4) sowie den *efg1*-Deletionsstamm (HLC67) transformiert.

Um die Grundaktivität des *SAP2*-Promotors zu untersuchen, wurden zunächst Vorversuche zur Aktivität in verschiedenen Medien durchgeführt. Hierfür wurden Transformanten des Plasmids pSAPp-1050 in verschiedenen Medien angezogen und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Wie in Abb. 43 zu sehen hat der *SAP2*-Promotor in YCB-Medium mit BSA die höchste Aktivität. Für die weiteren Untersuchungen zur Regulation des Promotors wurden die Stämme deshalb in diesem Medium angezogen. Die in der Abb. 42 dargestellten Reporterkonstrukte wurden sowohl



in den Wildtyp (CAI4) als auch in den *efg1*-Deletionsstamm (HLC67) integriert. Die durch den *SAP2*-Promotor vermittelte Luziferaseaktivität in den beiden Stammhintergründen ist in der Abb. 44 dargestellt. Bei der etwa 1 kb großen Promotorfusion konnte im *efg1*-Deletionsstamm eine zwei bis dreifach höhere Aktivität gemessen werden, welches die vermutete Repression durch Efg1p bestätigt. Nach Deletion des MCB-Elements war diese Regulation weiterhin zu beobachten. Die Repression des *SAP2*-Promotors durch Efg1p findet somit nicht über das MCB-Element statt. Bei der nur 550 bp langen Promoter-fusion konnte kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *efg1*-Mutante beobachtet werden. Auch die Deletion des MCB-Elementes hatte hier keinen Einfluss. Die DNA-Sequenz die für die Efg1p vermittelte Reprimierung verantwortlich ist, muss somit zwischen -550 bp und -1050 bp vor dem Startkodon liegen.



## 4 Diskussion

In den letzten Jahren ist die Zahl lebensbedrohlicher Pilzinfektionen, insbesondere hervorgerufen durch *C. albicans*, stetig gestiegen (Edmond *et al.*, 1999; Abi-Said *et al.*, 1997). Ursache hierfür ist, neben Krankheiten wie AIDS, die moderne Medizin, die durch den Einsatz von Chemotherapeutika, Immunsuppressiva oder chirurgischen Eingriffen das Immunsystem des Menschen schwächt (Fraser *et al.*, 1992; Kao *et al.*, 1999). Das geschwächte oder defekte Immunsystem begünstigt die Verbreitung des Kommensalen *C. albicans*, welches bis zur Ausbildung oft tödlich verlaufender systemischer Candidosen führen kann. Da bis heute nur wenige wirksame Antimykotika zur Verfügung stehen, die gezielt und ohne Nebenwirkung den Pilz bekämpfen, ist man bemüht, die molekularen Zusammenhänge der Virulenz des Kommensalen zu verstehen. Die Fähigkeit von *C. albicans* seine Wachstumsform je nach Umweltbedingung anzupassen, wird als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren angesehen (Ernst, 2000, Calderone und Fonzi, 2001). Das Wachstum als kugelige Blastospore ermöglicht eine schnelle Vermehrung und Verbreitung im Wirt über den Blutkreislauf (Cutler, 1991). Die Ausbildung von filamentösen Zellen hingegen erleichtert es dem Pilz an Epithelien zu adhären und das Gewebe zu penetrieren (Calderone und Braun, 1991; Sherwood *et al.*, 1992). Der Transkriptionsfaktor Efg1p gilt innerhalb eines cAMP abhängigen Signalwegs als zentraler Regulator der Morphogenese von *C. albicans* (Ernst, 2000). Das Expressionsniveau von *EFG1* ist entscheidend für die Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen. So führt die Überexpression von *EFG1* zu Ausbildung von Pseudohyphen, während *efg1*-Deletionsstämme unter den meisten Bedingungen nicht mehr in der Lage sind Hyphen zu bilden (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Die Regulation der Expressionsstärke von *EFG1* wird unter anderem durch eine autoregulatorische Repression des *EFG1*-Gens erreicht (Tebarth, 2001, Doedt, 2000). Als Transkriptionsfaktor obliegt Efg1p die Aufgabe die Transkription von Genen durch die Bindung an Promotorbereiche zu aktivieren oder reprimieren. Obwohl einige wenige Gene bekannt sind die in Abhängigkeit von Efg1p exprimiert werden, konnten bis zum heutigen Zeitpunkt keine direkten Zielgene identifiziert werden. Der kürzlich identifizierte Transkriptionsfaktor Efh1p stellt ein homologes Protein zu Efg1p dar (Bockmühl, 2001). Beide Proteine gehören zu einer mittlerweile sieben Mitglieder-umfassenden Proteinfamilie, die alle an der Regulation morphogenetischer Prozesse in Pilzen beteiligt sind. Durch die Überexpression von *EFH1* konnte gezeigt werden, dass auch Efh1p an der Regulation der Morphogenese beteiligt ist (Bockmühl, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Gene *EFG1* und *EFH1* auf die Morphogenese von *C. albicans* sowie die Regulation ihrer Expression untersucht. Des Weiteren wurde der Mechanismus der autoregulatorischen Funktion von Efg1p aufgeklärt, und *EFG1* selbst als direktes Zielgen von Efg1p identifiziert. Durch genomweite Transkriptomanalysen mit Hilfe der DNA-Microarraytechnologie konnten neue Hinweise auf die Funktion von Efg1p und Efh1p gewonnen werden. Durch Reporterstudien konnte die Regulation der Gene *SAP2* und *FLO1* durch Efg1p bestätigt werden.

#### 4.1 Überexpression von *EFG1* und *EFH1* induziert pseudohyphales Wachstum und reprimiert echte Hyphenbildung

Die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Efh1p gehören zu einer Gruppe von Proteinen, welche lediglich in Pilzen identifiziert wurden und in einer etwa 100 AS großen Region bis zu 95% konserviert sind. Alle sieben Proteine dieser Gruppe sind an der Regulation morphogenetischer Prozesse beteiligt. So steuern AnStuAp und PmStuAp die Konidiophorenbildung und NcAsm1p die Ascosporenreife (Bornemann *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1992; Aramajo *et al.*, 1996). In dem am besten untersuchten Ascomyceten *S. cerevisiae* steuern zwei Proteine in antagonistischer Weise die Bildung von Pseudohyphen (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995). Die Überexpression von Phd1p stimuliert die Filamentbildung, während Sok2p die Ausbildung von Pseudohyphen inhibiert.

Mit der Identifizierung von Efh1p (Bockmühl, 2001) konnte kürzlich auch in *C. albicans* neben Efg1p ein zweites APSES-Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den homologen Proteinen aus *S. cerevisiae* haben sowohl Efg1p als auch Efh1p bei Überproduktion einen positiven Einfluss auf die Pseudohyphenbildung (siehe 3.1). Bei der Überexpression von *EFH1* in der *efg1*-Mutante ist dieser positive Effekt auf die Pseudohyphenbildung jedoch nicht mehr zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Efh1p vermittelte Pseudohyphenbildung über das Efg1-Protein verläuft. Denkbar ist einerseits eine Aktivierung der *EFG1*-Expression oder aber eine Aktivierung des Efg1-Proteins durch Efh1p. Ein ähnlicher Zusammenhang ist auch in *S. cerevisiae* bekannt. Ein *sok2*-Deletionstamm zeigt nur in Anwesenheit von Phd1p die verstärkte Pseudohyphenbildung. Bei gleichzeitiger Deletion von *phd1* hat die *sok2*-Deletion keinen Effekt (Ward *et al.*, 1995). Die Frage, welches APSES-Protein aus *C. albicans* welchem APSES-Protein aus *S. cerevisiae* homolog ist, lässt sich nur schwer beantworten. Die Aminosäuresequenz innerhalb der APSES-Domäne (siehe Abb. 4) ist bei allen vier Proteinen hoch konserviert und Vergleiche der geringen Unterschiede innerhalb dieser Domäne lassen keinen Rückschluss auf Ähnlichkeiten zu. Außerhalb der APSES-Domäne zeigen die vier Proteine keine signifikante Sequenzidentität. Hinsichtlich der Größe der Proteine und der Lage der APSES-Domäne innerhalb des Proteins ist Efh1p zu Sok2p und Efg1p zu Phd1p ähnlich. Obwohl Efh1p im Unterschied zu Sok2p die Pseudohyphenbildung aktiviert, benötigen beide Proteine zur Ausprägung ihres Phänotyps das zweite APSES-Protein Efg1p bzw. Phd1p. Im Gegensatz dazu steht die Tatsache, dass Efg1p in der Lage ist den reprimierenden Effekt von Sok2p auf die Expression des Transkriptionsaktivators Ime1p in *S. cerevisiae* zu komplementieren (Shenhar und Kassir, 2001). Der Vergleich macht deutlich, dass die APSES-Proteine in *S. cerevisiae* eine antagonistische und in *C. albicans* eine eher synergetische Funktion besitzen.

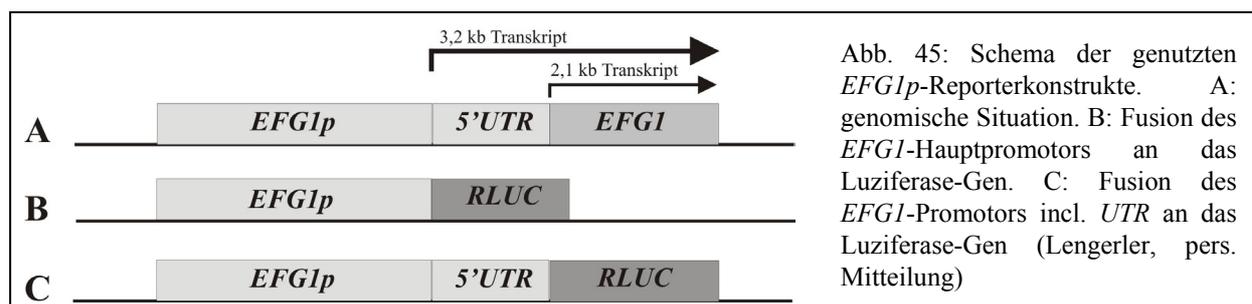
*C. albicans* ist im Gegensatz zu *S. cerevisiae* auch in der Lage echte Hyphen zu bilden, die sich sowohl in ihrer Entstehung als auch in der Morphologie von den Pseudohyphen unterscheiden. *efg1*-Deletionsstämme sind unter den meisten hypheninduzierenden Bedingungen nicht mehr in der Lage echte Hyphen zu bilden (Lo *et al.*, 1997). Die Deletion von *EFH1* hingegen beeinflusst die Fähigkeit zur Hyphenbildung nicht. Northernanalysen zeigten, dass während der Initiation der Hyphenbildung das *EFG1*-Transkript stark herunterreguliert wird und dass eine konstante nicht reprimierte *EFG1*-Expression die Ausbildung echter Hyphen inhibiert (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass Efg1p für die Initiation der Hyphenbildung nötig ist, bei der Proliferation der Hyphenzellen jedoch eine inhibierende Wirkung besitzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überproduktion von Efh1p ebenfalls die Hyphenbildung verhindert (siehe 3.2). Der inhibitorische Effekt der *EFHI*-Überexpression ist zudem stärker ausgeprägt als bei der *EFG1*-Überexpression. Während Stämme, die *EFG1* überexprimieren, zu Beginn noch echte Hyphen bilden können (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003), können Zellen, die *EFHI* überexprimieren, keine echte Hyphen bilden. Neben den Überexpressionstämmen von *EFG1* und *EFHI* zeigen auch einige Deletionsmutanten wie *tup1*, *fkh2*, *ssn6* oder *sin3* eine konstitutive Pseudohyphenbildung und diese sind gleichzeitig nicht mehr in der Lage echte Hyphen zu bilden (Braun und Johnson, 1997; Bensen *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2003; A. Dominguez, pers. Mitteilung). So scheint es wahrscheinlich, dass die Ausbildung von Pseudohyphen per se die echte Hyphenbildung inhibiert, und dass diese Inhibierung nicht spezifisch auf den Auslöser der Pseudohyphen zurückzuführen ist.

## 4.2 Regulation des *EFG1*- und *EFHI*-Promotors

Um Hinweise auf die Expressionsstärke und die Regulation des *EFHI*-Promotors zu erhalten, wurde der Promotor an das Reportergen *RLUC* fusioniert und mit der Expression und Regulation des *EFG1*-Promotors verglichen. Northernanalysen zeigten, dass das *EFG1*-Gen in zwei verschieden große Transkripte transkribiert wird (Tebarth, 2001, siehe Abb. 45: A). Das größere Transkript besitzt eine etwa 1,2 kb große untranslatierte Region (*UTR*) und konnte in Northern-Analysen etwa 20-fach stärker als das kleinere Transkript detektiert werden. Die in dieser Arbeit genutzte *EFG1p-RLUC*-Fusion umfasst nur die als Hauptpromotor bezeichnete stromaufwärts liegende Region des größeren *EFG1*-Transkripts (stromaufwärts von -1202 bp, siehe Abb. 45: B).

Bei dem Vergleich des *EFHI*-Promotors mit dem *EFG1*-Hauptpromotor zeigte sich, dass der *EFHI*-Promotor etwa 20-fach schwächer ist. Luziferase-Messungen einer Fusion des *EFG1p* inklusive der 5'UTR (Abb. 45: C) zeigten sogar eine etwa 1000-fach höhere Aktivität (K. Lengeler, pers. Mitteilung). Möglicherweise stabilisiert die UTR das Transkript oder führt zu einer verstärkten Translation.



Das niedrige Expressionsniveau von *EFHI*, welches auch in Northern-Analysen bestätigt werden konnte (Tebarth, 2001), könnte ein Grund dafür sein, dass bei *EFHI*-Deletion im Gegensatz zur *EFG1*-Deletion keine phänotypischen Merkmale beobachtet werden konnten. Erst wenn die Expression des Gens durch eine Fusion an den *PCK1*-Promotor künstlich erhöht wird, zeigt sich ein Einfluss von Efh1p, welcher dem von Efg1p sehr ähnlich ist (siehe 3.2).

Unter mikroaerophilen Bedingungen konnte bei gleichzeitiger Deletion von *efg1* ein hyperfilamentöser Phänotyp der *efh1*-Deletion beobachtet werden (Stempel, 2003). Möglicher-

weise wird das *EFHI*-Gen unter solchen Bedingungen verstärkt exprimiert, so dass sich die Deletion phänotypisch bemerkbar macht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *EFHI*-Promotor im *efg1*-Deletionsstamm in glukosefreiem Medium eine etwa siebenfach stärkere Aktivität hat als im Wildtyp (siehe 3.7.2). Dies lässt darauf schließen, dass Efg1p den *EFHI*-Promotor reprimiert. Auch der *EFGI*-Promotor selbst, wird durch Efg1p reprimiert. Im Gegensatz zum *EFHI*-Promotor wird der *EFGI*-Promotor jedoch unabhängig von der Glukosekonzentration durch Efg1p reprimiert. Die Tatsache, dass der *EFHI*-Promotor bei Abwesenheit von Glukose eine erhöhte Aktivität zeigt, könnte auf eine zusätzliche Glukosereprimierung zurückzuführen sein. Diese Glukoseregulation könnte z.B. durch ein dem Mig1p ähnlichem Protein vermittelt werden, welches in *S. cerevisiae* zusammen mit dem Repressor Tup1p die Expression von Glukose reprimierten Genen inhibiert (Treitel und Carlson, 1995). In *C. albicans* konnte ein homologes Protein zu Mig1p identifiziert werden, welches wie auch in *S.cerevisiae* zusammen mit dem Tup1-Repressor die Expression von Genen reprimiert (Zaragoza *et al.*, 2000; Murad *et al.*, 2001). Reporterstudien in *C. albicans* zeigten, dass der *EFGI*-Promotor sowohl durch Überexpression von *EFGI*, aber auch im geringeren Maße durch die Überexpression von *EFHI* reprimiert wird (Tebarth, 2001). In dieser Arbeit konnte nur die Repression des *EFGI*-Promotors durch Efg1p selbst bestätigt werden (siehe 3.7.2), jedoch keine Repression durch Efh1p. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Experimente dieser Arbeit einen Vergleich der Deletionstämmen mit dem Wildtyp zeigten, während in den von Tebarth (2001) durchgeführten Experimenten eine Überproduktion von Efg1p und Efh1p untersucht wurde. Für die Repression des *EFGI*p ist vermutlich ein hoher Spiegel an Efh1p nötig. Die Aktivität des *EFHI*-Promotors blieb bei *EFHI*-Überexpression unverändert. In Abb. 46 ist Modell zur Regulation des *EFHI*- und *EFGI*-Promotors dargestellt.

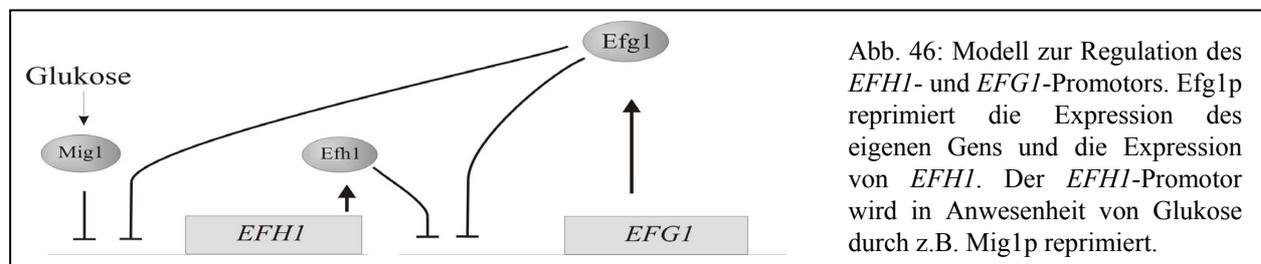


Abb. 46: Modell zur Regulation des *EFHI*- und *EFGI*-Promotors. Efg1p reprimiert die Expression des eigenen Gens und die Expression von *EFHI*. Der *EFHI*-Promotor wird in Anwesenheit von Glukose durch z.B. Mig1p reprimiert.

#### 4.2.1 *EFGI* ist autoreguliert und ein direktes Zielgen des eigenen Genprodukts

Wie in 4.1 bereits diskutiert, wird das *EFGI*-Transkript zu Beginn der Hypheninduktion nahezu vollständig reprimiert. Dieser Befund und die Tatsache, dass bei episomaler Überexpression von *EFGI* durch einen induzierbaren Promotor das genomische *EFGI*-Transkript nicht mehr nachweisbar ist, lieferten erste Hinweise auf die Autoregulation von *EFGI* (Sonneborn, 1999).

Die Expression von regulatorischen Proteinen, insbesondere von Transkriptionsfaktoren, ist oftmals autoreguliert. Der durch Kupfer regulierte Transkriptionsfaktor Amt1p aus *C. glabrata* wird beispielsweise positiv autoreguliert (Zhou und Thiele, 1993). Der humane Transkriptionsfaktor c-myc, die humane Histondeacetylase I (HDAC1), sowie die Expression des *IMD2*-Gens aus *S. cerevisiae* unterliegen hingegen einer negativen Autoregulation (Facchini *et al.*, 1997; Schuettengruber *et al.*, 2003; Escobar-Henriques *et al.*, 2003). Die Mechanismen der

Autoregulation können sehr unterschiedlich sein. Eine Möglichkeit der Aktivierung bzw. Reprimierung der eigenen Expression ist, wie im Falle von *Amt1p*, *c-myc* oder *HDAC1* die Bindung an den eigenen Promotor. Eine andere Möglichkeit besteht in einer so genannten „Feedback“-Regulation. Hierbei bindet nicht das autoregulierende Protein selbst, sondern wie im Falle der *IMD2*-Regulation, ein Endprodukt eines Biosyntheseweges, an den Promotor. Neben der Autoregulation auf transkriptioneller Ebene, gibt es auch Proteine die über die Stabilität oder Abbaurrate ihrer mRNA autoreguliert werden. Ein Beispiel hierfür stellt das für ein ribosomales Protein kodierende Gen *SUF14* aus *S. cerevisiae* dar (Hendrick *et al.*, 2001).

In parallelen Studien und Vorarbeiten konnte durch Fusion des *EFG1*-Promotors an die Reportergene *RLUC* oder *LAC4* und gleichzeitiger episomaler Überexpression von *EFG1* nachgewiesen werden, dass die Autoregulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Tebarth, 2001, Doedt, 2000). Durch Deletionsanalysen konnte weiterhin die Region, die für die Autoregulation verantwortlich ist, auf eine 45 bp große Region eingeschränkt werden (Tebarth, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Repression des *EFG1p* direkt über eine Bindung von *Efg1p* vermittelt wird, oder ob es sich um eine Feedback-Regulation durch *Efg1p*-aktivierte Proteine handelt. Durch ChIP-Analysen konnte gezeigt werden, dass *Efg1p* an den *EFG1*-Promotor bindet (siehe 3.5.1). Zwar konnte aufgrund der verwendeten Methode keine genaue Lokalisierung der DNA-Bindung durchgeführt werden, allerdings erwies sich die durch Tebarth (2001) ermittelte, für die Autoregulation nötige 45 bp große Region auch als Region, die durch *Efg1p* gebunden wird. Diese Region beinhaltet unter anderem die TATA-Box des *EFG1*-Promotors und liegt nur 35 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des größeren *EFG1*-Transkripts. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes inhibiert wird. Ein zentraler Mechanismus der Aktivierung und Reprimierung von eukaryotischen Genen ist die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen (Kurdistani und Grunstein, 2003). Durch die Acetylierung der Histone an N-terminalen Lysin-Resten durch Acetyltransferasen (HAT) werden positive Ladungen abgeschirmt. Dadurch wird die Affinität der negativ geladenen DNA zu den Histonen reduziert, so dass die Proteine der Transkriptionsmaschinerie wie das „TATA-Binding Protein“ (TBP) oder RNA-Polymerasen erleichtert an die DNA binden können. Die Entfernung der Acetylgruppen durch Histondeacetylasen (HDAC) hingegen ermöglicht eine dichtere Verpackung der DNA, so dass die Transkription von Genen reprimiert wird. Der zur Gruppe der Klasse I-Histondeacetylasen gehörende Proteinkomplex aus der Histondeacetylase *Rpd3p* und dem *Sin3*-Protein ist an der Repression vieler Gene beteiligt (Kurdistani *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2000). Die Rekrutierung dieses Komplexes an die DNA erfolgt über eine Interaktion mit DNA-bindenden

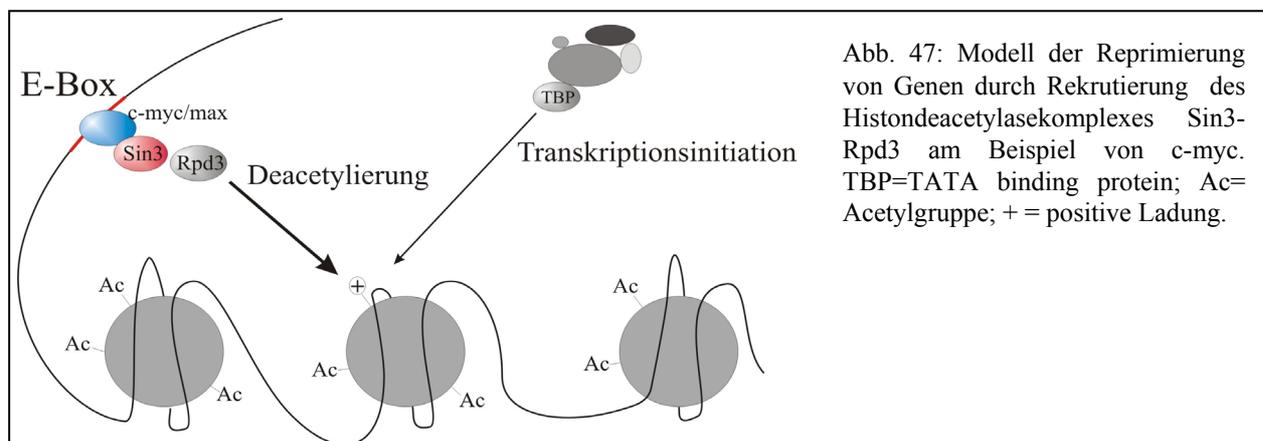


Abb. 47: Modell der Reprimierung von Genen durch Rekrutierung des Histondeacetylasekomplexes Sin3-Rpd3 am Beispiel von *c-myc*. TBP=TATA binding protein; Ac=Acetylgruppe; + = positive Ladung.

Proteinen wie Ume6p (Kadosh und Struhl, 1997).

In parallelen Studien konnte gezeigt werden, dass das *EFG1*-Gen in einer *sin3*-Mutante nicht autoreguliert ist und auch die Repression des *EFG1*-Transkripts während der Hypheninduktion ausbleibt (Tebarth, 2001, A. Dominguez, pers. Mitteilung). Durch ChIP-Experimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Sin3p ebenfalls wie Efg1p an den *EFG1*-Promotor bindet (siehe 3.5.2). Da bei der ChIP-Methode nicht nur Protein-DNA-Interaktionen sondern auch Protein-Protein-Interaktionen quervernetzt werden, ist es möglich auch eine Rekrutierung eines Proteins an die DNA über ein anderes Protein nachzuweisen. In Zwei-Hybrid- sowie in Koimmunpräzipitations-Experimenten konnte eine Interaktion von Sin3p und Efg1p nachgewiesen werden. Daher kann vermutet werden, dass der Histondeacetylasekomplex möglicherweise über Efg1p an die DNA gebunden wird.

Eine ähnliche Rolle wird auch dem humanen bHLH-Protein c-myc zugesprochen. c-myc ist ebenfalls wie *EFG1* autoreguliert und reprimiert viele Gene durch eine Rekrutierung des Sin3/Rpd3-Komplexes (siehe Abb. 47; Ayer *et al.*, 1995). Wie auch für *EFG1* ist für die c-myc-Autoregulation eine DNA-Region verantwortlich, die unmittelbar vor dem Transkriptionsstart liegt und vermutlich eine Rolle in der Transkriptionsinitiation hat (Li *et al.*, 1994).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen der *efg1*-Mutante sowie von *EFG1*-Überexpressionstämmen zeigen, dass Efg1p eine Vielzahl von Genen reprimiert. Auch in Ein-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Efg1p eine reprimierende Funktion besitzt (A. Brown, pers. Mitteilung). Neben der Beteiligung von Sin3p an der Reprimierung von *EFG1* könnte Sin3p auch an der Repression anderer durch Efg1p reprimierter Gene involviert sein. Diese Hypothese wird dadurch bestätigt, dass einige durch Efg1p reprimierte Gene, wie die für die Histone H3 und H4 kodierenden Gene *HHF22*, *HHF22* und *HHT21*, ebenfalls in Transkriptomanalysen einer *sin3*-Mutante reguliert sind (A. Dominguez, pers. Mitteilung). Die Abb. 48 zeigt ein Modell zur Autoregulation von *EFG1*. Nach Aktivierung von Efg1p über einen erhöhten cAMP-Spiegel und Phosphorylierung durch die Proteinkinase A bindet Efg1p an den eigenen Promotor. Über eine Interaktion mit dem Histondeacetylasekomplex I, bestehend aus Sin3p und Rpd3p, werden diese an die DNA rekrutiert. Die Histon-Deacetylierung führt dann zu einer verminderten Transkriptionsinitiation und somit zur reduzierten Expression von *EFG1*.

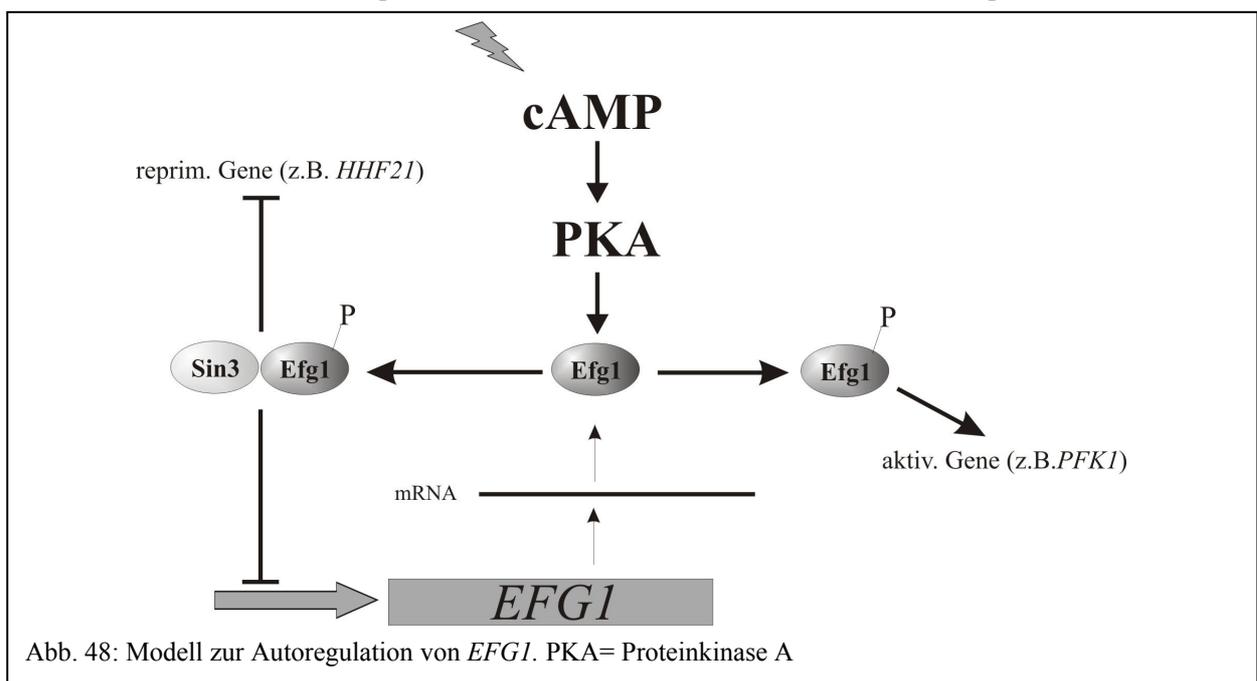
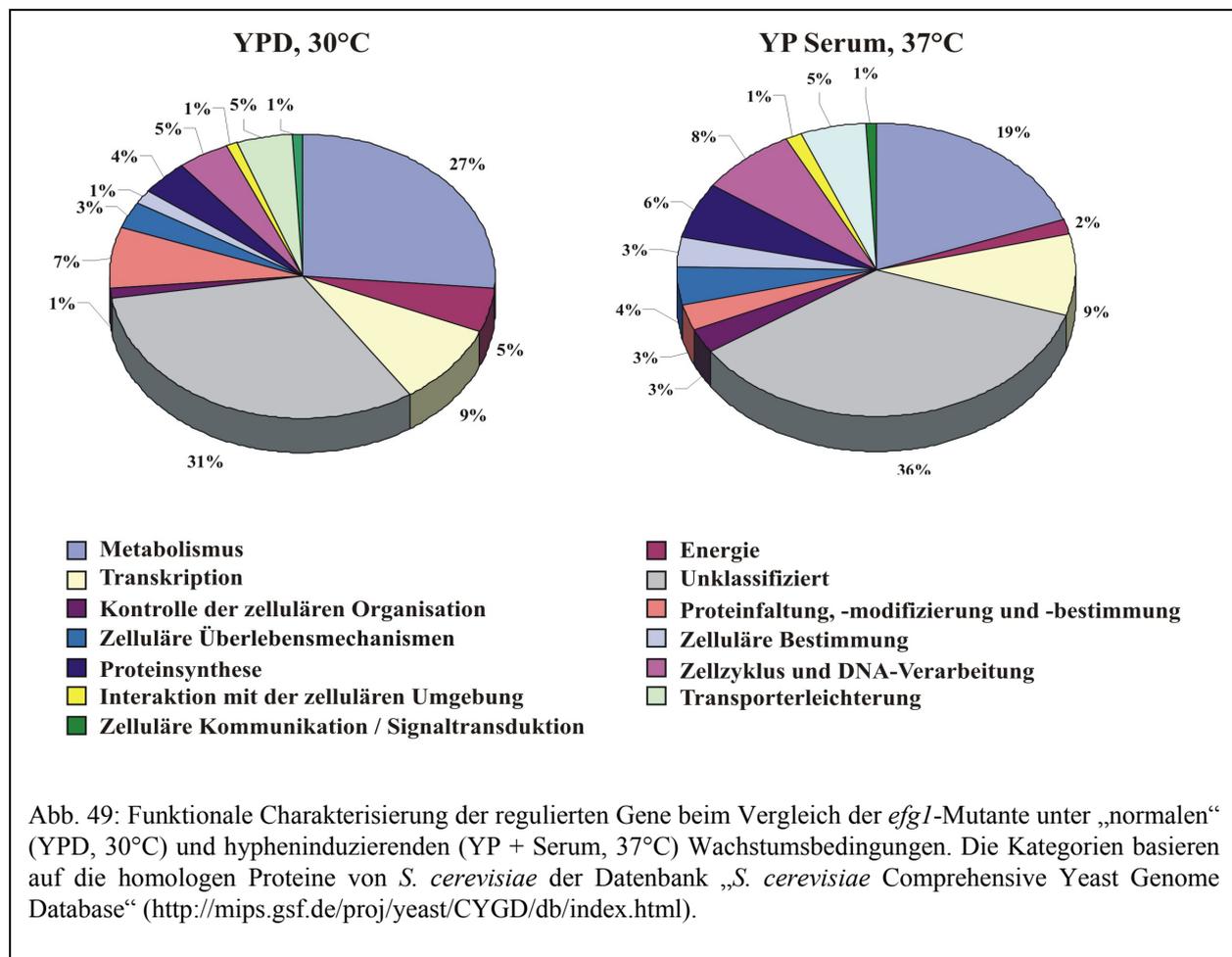


Abb. 48: Modell zur Autoregulation von *EFG1*. PKA= Proteinkinase A

Unklar bleibt jedoch, ob Efg1p direkt an den eigenen Promotor bindet, oder ob die DNA-Bindung durch ein anderes Protein vermittelt wird. Neben *EFG1* könnten auch andere Gene über eine Efg1p vermittelte Rekrutierung von Sin3p reprimiert werden, wie beispielsweise die durch Efg1p reprimierten für Histone kodierenden Gene *HHT21*, *HHF21* und *HHF22*.

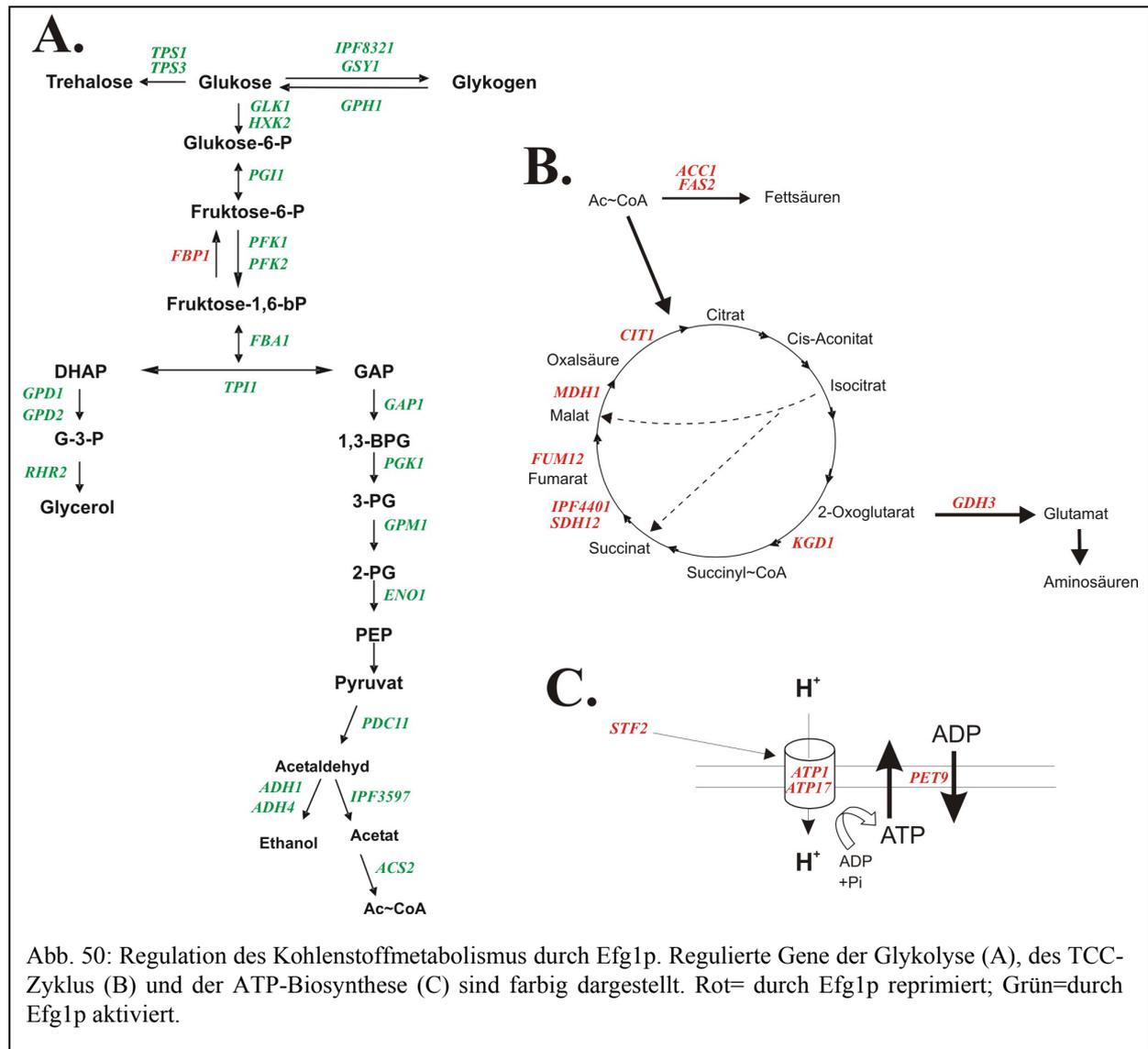
### 4.3 Efg1p ist ein Regulator des Kohlenstoffmetabolismus

Da *efg1*-Deletionsstämme starke Defekte in der Hyphenbildung zeigen, wurden bisherige Untersuchungen zu möglichen Zielgenen von Efg1p hauptsächlich unter hypheninduzierenden Bedingungen durchgeführt (Lane *et al.*, 2001b; Nantel *et al.*, 2002). Da *EFG1* in der Hefeform sehr stark exprimiert wird (Stoldt *et al.*, 1997), ist es nicht verwunderlich, dass wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in der Hefeform eine Vielzahl von Genen durch Efg1p reguliert wird.



Die Abb. 49 zeigt eine funktionelle Klassifizierung der durch Efg1p regulierten Gene unter hypheninduzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen. Neben einer großen Anzahl an unbekanntem und nicht klassifizierbaren Proteinen wird deutlich, dass Efg1p unter beiden Bedingungen einen enormen Einfluss auf Gene hat, die in den Metabolismus involviert sind. Weiterhin werden viele Gene, die an der Transkriptionsregulation, dem Zellzyklus oder der Proteinmodifizierung beteiligt sind, durch Efg1p reguliert. Unter den Genen, deren Proteine in den Metabolismus involviert sind fällt auf, dass der Großteil dieser Gene für Enzyme des

Kohlenhydratmetabolismus kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Gene, die für glykolytische Enzyme kodieren, durch Efg1p aktiviert werden, während Gene, die Proteine des Citrat-Zyklus (TCC) kodieren, durch Efg1p reprimiert werden. Abb. 50 veranschaulicht die Bedeutung von Efg1p für die Regulation des Kohlenstoffmetabolismus. Neben den Genen, die für Enzyme der Glykolyse kodieren, werden auch Gene, die für Enzyme der Trehalose- und Glykogensynthese kodieren, durch Efg1p aktiviert. Gene, die für Komponenten der Atmung bzw. ATP-Gewinnung kodieren, werden hingegen reprimiert.



Eine ähnliche Regulation des Metabolismus wurde kürzlich bei dem Transkriptomvergleich von Zellen der *opaque* und der *white*-Phase gezeigt (Lan *et al.*, 2002). Zellen der *white*-Phase zeigten eine verstärkte Expression der glykolytischen Gene und eine reduzierte Expression der für den TCC-Zyklus kodierenden Gene im Vergleich zu Zellen der *opaque*-Phase. Die Tatsache, dass ein *EFG1*-Transkript nur in Zellen der *white*-Phase, aber nicht in Zellen der *opaque*-Phase nachweisbar ist, lässt vermuten, dass die metabolischen Unterschiede der beiden Phasen auf Efg1p zurückzuführen sind. Die Anwesenheit von Efg1p fördert einen fermentativen Stoffwechsel und reprimiert die oxidative Energiegewinnung. Auch die morphologische Form

der *opaque*-Phase ist der der *efg1*-Mutante sehr ähnlich. Beide Zelltypen bilden leicht vergrößerte elongierte Zellen, deren Oberfläche so genannte „pimples“ tragen (Sonneborn, 1999, Slutzky *et al.*, 1987; Srikantha *et al.*, 2000). Allerdings können nicht alle Unterschiede zwischen der *white* und der *opaque*-Phase auf Efg1p zurückgeführt werden, da die Transkriptome der *efg1*-Mutante und Zellen der *opaque*-Phase zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch sind (vgl. Tab. 15 und Lan *et al.*, 2002). Durch Northern-Analysen konnte in dieser Arbeit die veränderte Expression von drei metabolischen Genen (*PFK1*, *FBA1* und *FUM12*) in der *efg1*-Mutante bestätigt werden (siehe 3.9). Der Grund für die geringeren Expressionsunterschiede von *PFK1* und *FBA1* in den Microarray-Analysen im Vergleich zu den Northern Blot-Analysen, liegt möglicherweise an der überdurchschnittlich starken Expression dieser Gene (siehe Abb. 27). Aufgrund der hohen Expression der Gene könnte es sein, dass die Signale der Fluorochromfarbstoffe nicht mehr im linearen Bereich des Scanners liegen. Die reduzierte glykolytische Aktivität der *efg1*-Mutante konnte durch eine verstärkte Sensitivität gegenüber Antimycin A bestätigt werden. Antimycin A inhibiert die Energiegewinnung durch die Atmungskette, so dass die Zellen lediglich durch die Glykolyse ATP gewinnen können. Da die *efg1*-Mutante somit weniger ATP bilden kann, zeigt sie eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit.

Die durch Efg1p aktivierte Phosphofruktokinase (PFK) ist ein wichtiges Enzym der Glykolyse. Lorberg *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Aktivität dieses Enzyms während der Hypheninduktion abnimmt. Ein Grund hierfür könnte die Abnahme der *EFG1*-Expression während der frühen Phase der Hypheninduktion sein. Die Aktivität der PFK nimmt zwar erst zu einem späteren Zeitpunkt der Hypheninduktion ab, da Efg1p jedoch möglicherweise die Expression nur indirekt aktiviert, könnte der Einfluss verzögert sein. Übereinstimmend mit dieser Hypothese ist die verstärkte Expression einiger ribosomaler Gene während der Hypheninduktion (Delbrück *et al.*, 1997). Wie in der Tab. 15 und Tab. 16 (siehe Anhang) zu sehen, werden viele ribosomale Gene durch Efg1p reprimiert, die möglicherweise durch die Abnahme von Efg1p während der Hypheninduktion verstärkt exprimiert werden.

Durch Transkriptomanalysen konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch Nrg1p die Glykolyse reguliert (A. Brown, pers. Mitteilung). Der Transkriptionsregulator Nrg1p reprimiert filamentöses Wachstums in *C. albicans* über eine Rekrutierung des Repressorproteins Tup1p (Murad *et al.*, 2001; Braun und Johnson, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die glykolytischen Gene in der *nrg1*-Mutante verstärkt exprimiert werden und Nrg1p somit diese Gene reprimiert. Weder für Efg1p, noch für Nrg1p konnte allerdings eine direkte Aktivierung der Glykolyse-Gene gezeigt werden. Es ist möglich, dass entweder Nrg1p oder Efg1p die Expression des anderen Proteins reprimiert, und somit nur einen indirekten Einfluss auf die Expression der glykolytischen Gene hat. Jedoch konnte weder für Efg1p noch für Nrg1p eine Regulation durch den anderen Transkriptionsfaktor gezeigt werden. Daher ist es wahrscheinlicher, dass der Einfluss auf diese Gene entweder unabhängig voneinander oder über die gemeinsame Regulation eines dritten Proteins ausgeübt wird.

Die Bedeutung des Metabolismus für die Virulenz von *C. albicans* wird in letzter Zeit vielfach diskutiert. Ausgangspunkt hierfür war die erhöhte Expression der für Enzyme des Glyoxylatzyklus kodierenden Gene nach Phagozytose durch Makrophagen, und die Tatsache, dass die Deletion dieser Gene zu einer reduzierten Virulenz führt (Prigneau *et al.*, 2003; Lorenz und Fink, 2001). Auch bei dem pathogenen Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* spielt der Glyoxylatzyklus eine entscheidende Rolle für die Pathogenität (Lorenz und Fink, 2002). Ein pathogener Organismus muss bei der Kolonialisierung im Wirt nicht nur dem Immunsystem

entgehen, sondern er muss sich auch den unterschiedlichsten Bedingungen im Wirt anpassen. Nicht nur das Nährstoffangebot sondern auch die Sauerstoffkonzentration variiert stark innerhalb des menschlichen Körpers. Während das Blut reich an Glukose und Sauerstoff ist, ist innerhalb der Gewebe nur wenig Sauerstoff vorhanden. Um weiterhin eine ausreichende Energieversorgung zu garantieren, muss der Pilz in der Lage sein, zwischen oxidativen und fermentativen Stoffwechsel zu wechseln. Der Transkriptionsfaktor Efg1p könnte an dieser Regulation beteiligt sein. Im Abschnitt 4.2.1 wurde die Homologie zwischen Efg1p und dem humanen Transkriptionsfaktor c-myc diskutiert. Auch die in diesem Abschnitt diskutierte Regulation der Glykolyse durch Efg1p ist eine weitere Gemeinsamkeit zu c-myc. Wie Efg1p aktiviert c-myc die Expression glykolytischer Gene (Nasi *et al.*, 2001; Osthus *et al.*, 2000). Obwohl die beiden Proteine aus zwei unterschiedlichen Organismen stammen, weisen sie nicht nur eine Sequenzhomologie auf, sondern zeigen auch viele funktionelle Ähnlichkeiten auf, die in Tab. 14 zusammengefasst sind.

Tab. 14: Ähnlichkeiten zwischen Efg1p und dem humanen Transkriptionsfaktor c-myc

	Efg1p	c-myc
DNA-Bindedomäne	bHLH	bHLH
DNA-Erkennungssequenz	E-Box ( <i>in vitro</i> ) MCB-Element ( <i>in vivo</i> )	E-Box
Transkript	Negativ Autoreguliert über Inhibierung der Transkriptionsinitiation	Negativ Autoreguliert über Inhibierung der Transkriptionsinitiation
Repressormechanismus	Benötigt den Sin3p- Deacetylase-Komplex	Benötigt den Sin3p- Deacetylase-Komplex
Einfluss auf Proliferation	Induziert Proliferation (Pseudohyphen)	Induziert Proliferation (verkürzter G1-Arrest, verzögerte G2-Phase)
Einfluss auf Differenzierung	Essentiell für Induktion, Inhibierung der terminalen Differenzierung	Essentiell für Induktion, Inhibierung der terminalen Differenzierung
Einfluss auf Metabolismus	Transkriptionelle Aktivierung der Glykolyse	Transkriptionelle Aktivierung der Glykolyse

#### 4.4 Efg1p reguliert die Expression von Virulenzfaktoren

Viele der durch Efg1p regulierten Gene, wie die glykolytischen Gene, werden sowohl unter nicht-induzierenden Wachstumsbedingungen, als auch unter hypheninduzierenden Bedingungen reguliert. Von den Genen, die unter beiden Wachstumsbedingungen reguliert werden, wird nur wenigen eine entscheidende Rolle für die Virulenz von *C. albicans* zugesprochen. Eines dieser Gene ist das Gen *FTRI*, welches für eine hochaffine Eisen-Permease kodiert. Das *FTRI*-Gen

wird unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen durch Efg1p reprimiert. In Tierinfektionsmodellen konnte gezeigt werden, dass *ptr1*-Mutanten avirulent sind (Ramana und Wang, 2000). Eisen ist ein wichtiger Wachstumsfaktor der von Mikroorganismen oft durch spezielle Siderophoren gebunden und aufgenommen wird. Es konnte gezeigt werden, dass Eisen in *S. cerevisiae* die Transkriptstabilität der glykolytischen Gene *TPI1* und *TDH3* erhöht (Krieger und Ernst, 1994). Möglicherweise könnte auch in *C. albicans* die Stabilität der Transkripte durch die intrazelluläre Eisenkonzentration reguliert sein und so indirekt der Metabolismus beeinflusst werden.

Auch die Expression von Genen, die eine Stressantwort in *C. albicans* vermitteln (*HSP12*, *DDR48*, *SOD22*, *IPF1222*), wird durch Efg1p gesteuert. Die Stressproteine sind wichtig für die Virulenz von *C. albicans*, da sie den Pilz gegen die Abwehr durch den Wirt schützen. Einige dieser Gene (*HSP12*) werden sowohl unter hypheninduzierenden als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen reguliert, während andere wie z.B. *DDR48* nur unter hypheninduzierenden Bedingungen reguliert werden. Durch die so genannten Superoxid-Dismutasen, die von Genen der SOD-Genfamilie kodiert werden, werden beispielsweise reaktive Sauerstoffverbindungen neutralisiert.

Besonders unter hypheninduzierenden Bedingungen reguliert Efg1p die Expression vieler Gene die für die Virulenz wichtig sind. So wird beispielsweise die Expression der Gene *HWPI*, *ALS1* und *ALS10*, die für Adhäsine kodieren (Staab *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 1999), unter induzierenden Bedingungen durch Efg1p aktiviert.

#### **4.5 Einfluss der *efh1*-Deletion sowie einer *EFH1*- und *EFG1*-Überexpression auf das Transkriptom von *C. albicans***

Transkriptomanalysen zeigen, dass die Deletion von *EFH1* sowohl unter „normalen“, als auch unter hypheninduzierenden Bedingungen kaum einen Einfluss auf das Transkriptom hat. Ein Grund hierfür könnte die geringe Expression von *EFH1* sein, die sowohl in Northern-Analysen (Tebarth, 2001) als auch in Promotorstudien (siehe 3.7) gezeigt wurde. Möglicherweise wird das Gen nur unter bestimmten noch nicht identifizierten Bedingungen exprimiert. Die geringe Anzahl an durch Efh1p regulierten Genen korreliert mit der Tatsache, dass die *EFH1*-Deletion keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigt. Wird die Expression des Gens jedoch künstlich erhöht, zeigen die Zellen phänotypische Besonderheiten. Durch Fusion an den *PCK1*-Promotor konnte gezeigt werden dass die Überexpression von *EFH1* zur Bildung von Pseudohyphen führt und die Ausbildung echter Hyphen inhibiert (siehe 3.1 und 3.2). Zuvor konnte Tebarth (2001) zeigen, dass die Überexpression von *EFH1* in Zellen der *opaque*-Phase einen verstärkten Wechsel zur *white*-Phase induziert. Alle drei dieser für die *EFH1*-Überexpression identifizierten Phänotypen wurden bereits in vorangegangenen Studien für die Überexpression von *EFG1* beschrieben (Stoldt *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999b; Tebarth *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Pseudohyphenbildung bei *EFH1*-Überexpression Efg1p nötig ist. Die ähnlichen Phänotypen könnten möglicherweise auf eine Aktivierung der Efg1p-Aktivität oder der *EFG1*-Expression durch Efh1p zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zur Deletion von *EFH1* hat die Überexpression einen deutlichen Einfluss auf das Transkriptom. Da die Überproduktion von Efg1p und Efh1p ähnliche Phänotypen zeigt, ist es nicht verwunderlich, dass manche Gene in beiden Stämmen gleich reguliert werden. Auffällig ist, dass unter den gemeinsam aktivierten Genen einige Gene (z.B. *HWPI*, *ALS10* und *ECE1*)

sind, die bisher als spezifisch für echte Hyphenzellen galten (Braun and Johnson, 2000; Lane *et al.*, 2001b). Da diese Gene bei der Efg1p und Efh1p vermittelten Pseudohyphenbildung hochreguliert sind, sind die Proteine eher charakteristisch für elongiertes Zellwachstum statt nur für die echte Hyphenbildung. Fraglich bleibt, ob die bei Efh1p regulierten Gene von Efh1p direkt oder über eine Aktivierung von Efg1p reguliert werden. Für die letztere Hypothese spricht die Tatsache, dass eine Efh1p vermittelte Pseudohyphenbildung nur bei Anwesenheit von Efg1p zu beobachten ist (siehe 3.1). Die Möglichkeit der Aktivierung der *EFG1*-Expression durch Efh1p ist unwahrscheinlich, da in den DNA-Microarrays keine Erhöhung des *EFG1*-Transkripts bei *EFH1*-Überexpression beobachtet wurde.

Zwar sind die Transkriptome der *EFG1* und *EFH1*-Überexpressionsstämme einander sehr ähnlich (siehe 3.8.2, Abb. 23), jedoch sind einige Gene auch unterschiedlich reguliert. Daraus lässt sich schließen, dass Efh1p auch unabhängig von Efg1p eine regulatorische Funktion besitzt.

Das Modell in Abb. 51 zeigt schematisch die Funktionen von Efg1p und Efh1p in *C. albicans*. Änderungen der zellulären Umgebung wie Temperaturänderungen oder die Anwesenheit von Serum werden über bisher unbekannte Proteine sensiert. Über Signaltransduktionswege (z.B. PKA-Weg) werden daraufhin die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Efh1p aktiviert. Diese aktivieren und reprimieren die Transkription von Genen, die einerseits für grundlegende zelluläre Prozesse wie die Glykolyse nötig sind und andererseits die Virulenz von *C. albicans* vermitteln (Adhäsine). Die Rolle von Efh1p liegt hierbei möglicherweise in der Aktivierung von Efg1p.

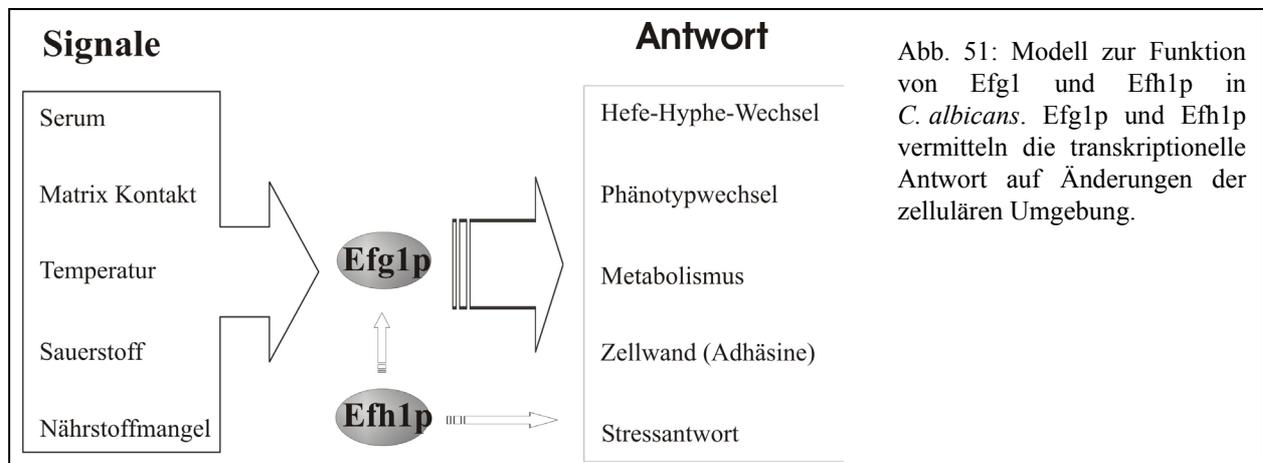
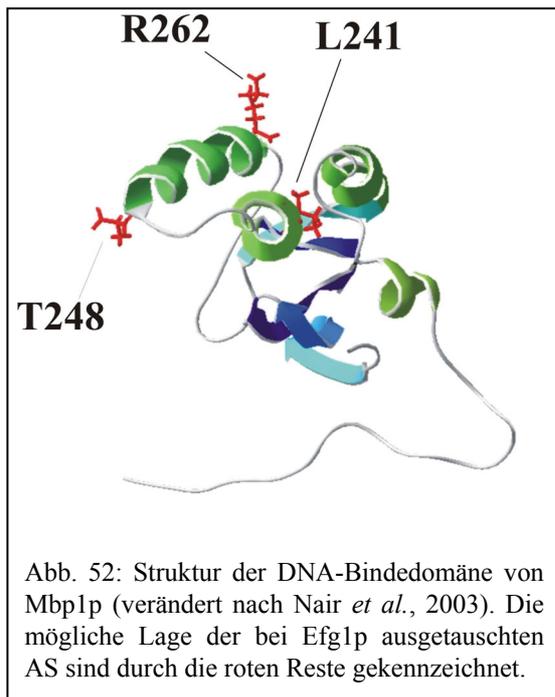


Abb. 51: Modell zur Funktion von Efg1p und Efh1p in *C. albicans*. Efg1p und Efh1p vermitteln die transkriptionelle Antwort auf Änderungen der zellulären Umgebung.

#### 4.6 Efg1p bindet *in vivo* an ein MCB-Element

Efg1p besitzt innerhalb der hoch konservierten APSES-Domäne eine bHLH-DNA-Bindedomäne. Viele bHLH-Proteine, wie beispielsweise c-myc, binden an die DNA über eine 6 bp lange Sequenz, die als E-Box bezeichnet wird. Obwohl Efg1p *in vitro* eine E-Box binden kann (Leng *et al.*, 2001), wurde *in vivo* noch keine DNA-Erkennungssequenz für Efg1p publiziert. DNA-Sequenzen, die von Transkriptionsfaktoren *in vitro* gebunden werden, werden nicht zwangsläufig auch *in vivo* als Erkennungssequenz genutzt, wie am Beispiel des Gcn4-Proteins gezeigt wurde (Suckow und Hollenberg, 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Efg1p *in vivo* an eine dreifache Kopie eines MCB-Elementes binden kann (Doedt, 2000). In



dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch eine einzelne Kopie der 6 bp langen palindromischen Sequenz (ACGCGT) ausreicht, um eine Aktivierung des Reportergens über Bindung von Efg1p zu aktivieren. Spezifische Aminosäureaustausche innerhalb der APSES-Domäne von Efg1p zeigten, dass diese Region die DNA-Bindung vermittelt. Es bleibt jedoch unklar, ob die ausgetauschten Aminosäuren T248E und R262L direkt an der Kontaktierung der DNA beteiligt sind, oder ob möglicherweise durch die Aminosäureaustausche lediglich die Tertiärstruktur des Proteins beeinflusst wird. Die Struktur der DNA-Bindedomäne des Mbp1-Proteins, welches ebenfalls an MCB-Elemente bindet, konnte durch Röntgenstrukturanalysen bereits detailliert aufgeklärt werden (Nair *et al.*, 2003). Da Efg1p und Efh1p innerhalb der APSES-Domäne eine hohe Sequenz-

identität zu Mbp1p zeigen, könnte die Struktur für Efg1p und Efh1p sehr ähnlich sein. In Abb. 52 ist schematisch die Kristallstruktur von Mbp1p und die mögliche Lage der Aminosäuren L241, T248 und R262 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die Aminosäuren R262 und T248, welche essentiell für die DNA-Bindung sind, sich beide innerhalb einer alpha-Helix befinden, welche möglicherweise die DNA bindet. Durch die Austausch könnte die Struktur des Proteins so geändert werden, dass die alpha-Helix nicht ausgebildet werden kann und keine DNA-Bindung erfolgt. Trotz der Homologie von Efh1p zu Efg1p innerhalb der DNA-Bindedomäne konnte in dieser Arbeit keine Bindung von Efh1p an ein MCB-Element gezeigt werden. Beim Vergleich der Aminosäuren-Positionen T248 und R262, die essentiell für die DNA-Bindung von Efg1p sind, mit den entsprechenden Positionen in Efh1p fällt auf, dass diese identisch bzw. sehr ähnlich sind. An der Position T248 in Efg1p ist auch bei Efh1p ein Threonin, und an Position R262 ist bei Efh1p ein sehr ähnlicher Lysin-Rest. Daraus lässt sich schließen, dass diese Aminosäuren vermutlich nicht direkt die DNA-Bindung vermitteln, da ansonsten auch eine Bindung für Efh1p gezeigt werden müsste. Wahrscheinlicher ist, dass beispielsweise der große Rest der Glutaminsäure die DNA-Bindung sterisch verhindert.

Die Funktion des MCB-Elementes ist in *C. albicans* ungeklärt. In *S. cerevisiae* ist diese DNA-Sequenz in den Promotoren von Zellzyklus regulierten Genen zu finden, deren Genprodukte hauptsächlich an der DNA-Synthese und DNA-Reparatur beteiligt sind (Johnson und Lowndes, 1992). In *C. albicans* ist lediglich von dem *DUTI*-Gen eine MCB-Element abhängige Regulation bekannt (McIntosh *et al.*, 1994). Northern Blot-Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass dieses Gen unabhängig von Efg1p reguliert wird (Daten nicht gezeigt).

## 4.7 Die Gene *FLO1* und *SAP2* werden durch Efg1p reguliert

Efg1p bindet *in vivo* an MCB-Elemente. Obwohl rein statistisch ein 6 bp lange DNA-Sequenz wie die *MluI*-Schnittstelle rund alle 4 kb auftreten müsste, ist diese Sequenz im Genom von *C. albicans* nur sehr selten vorhanden. Dies spricht dafür, dass MCB-Elemente auch in *C. albicans* eine regulatorische Funktion besitzen. Bei der Promotoranalyse der am stärksten durch Efg1p regulierten Gene fällt auf, dass einige davon ein MCB-Element tragen. Um einerseits die Daten aus den Microarray-Experimenten zu bestätigen und um eine mögliche Regulation durch das MCB-Element zu zeigen wurde einer dieser Promotoren (*FLO1p*) an das Reporter-gen *RLUC* fusioniert.

Das *FLO1*-Gen kodiert für ein GPI-Zellwandprotein, welches nur in der Hefeform exprimiert und während der Hypheninduktion stark reprimiert wird (Sohn *et al.*, 2003; Nantel *et al.*, 2002). Aus diesem Grund bezeichneten Sohn *et al.* dieses Gen als *YWPI* (yeast wall protein1). Beim Vergleich des Expressionsniveaus im Wildtyp unter „normalen“ und hypheninduzierenden Bedingungen (siehe Abb. 27) konnte diese Reprimierung bestätigt werden.

Die Reporter-genstudien mit den *FLO1p-RLUC*-Fusionen bestätigten, dass der *FLO1*-Promotor durch Efg1p aktiviert wird. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung des Promotors in glukosehaltigem SD-Medium stärker ist, als in glukosefreiem SCAA-Medium. Eine Glukose abhängige Regulation wurde auch bei dem zu Efg1p homologen Protein Sok2p beschrieben (Shenhar und Kassir, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Sok2p in Anwesenheit von Glukose eine Funktion als Repressor besitzt, während in Abwesenheit von Glukose sich das Verhalten ändert und Sok2p zu einem Aktivator wird. In *S. cerevisiae* wird der PKA-Signaltransduktionsweg durch einen hohen Glukosespiegel aktiviert (Kraakman *et al.*, 1999; Beullens *et al.*, 1988). Da Efg1p in *C. albicans* als ein Target der PKA angesehen wird (Bockmühl und Ernst, 2001), ist es möglich, dass Efg1p bei einer erhöhten Glukosekonzentration durch die PKA phosphoryliert wird. Auf diese Weise aktiviertes Efg1p kann dann die Transkription von Genen wie z.B. *FLO1* aktivieren.

Die Deletion des MCB-Elementes innerhalb des *FLO1*-Promotors zeigte keinen Einfluss auf dessen Regulation (siehe 3.13). Die Aktivierung durch Efg1p erfolgt demnach entweder über eine andere DNA-Bindungsstelle oder über ein anderes, möglicherweise durch Efg1p aktiviertes Protein. Um eine Region, die für die Efg1p vermittelte Aktivierung nötig ist, zu identifizieren, wurden in den *FLO1p* bis zu 1300 bp vor dem Translationsstart Deletionen eingefügt. Die durchgeführten Deletionen führten zwar teilweise zu einer reduzierten Gesamtaktivität, jedoch konnte bei allen Konstrukten in Anwesenheit von Glukose im Wildtyp eine höhere Aktivität als in der *efg1*-Mutante gemessen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Region, die für die Efg1p vermittelte Aktivierung verantwortlich ist, stromaufwärts der ersten Deletionen (-1303 bp) liegt.

Da die Aktivierung des *FLO1*-Promotors unabhängig von dem MCB-Element ist, wurde überprüft, ob diese Sequenz möglicherweise nur bei Efg1p-reprimierten Genen eine Funktion besitzt. Promotoranalysen von durch Efg1p reprimierten Genen zeigten, dass das *SAP2*-Gen 521 bp vor dem Startkodon ein MCB-Element besitzt. Wie auch bei dem *FLO1*-Promotor wurde die Aktivität zweier unterschiedlich langer *SAP2*-Promotor-*RLUC*-Fusionen im Wildtyp und im *efg1*-Deletionsstamm bestimmt. Bei der Fusion eines 1050 bp großen Promotorfragmentes konnte eine etwa zwei bis dreifache höhere Aktivität in der *efg1*-Mutante bestimmt werden. Da dieser Effekt bei einem nur 550 bp großen Promotorfragment nicht zu beobachten war, kann

davon ausgegangen werden, dass sich zwischen den Nukleotiden -550 und -1050 eine Sequenz befindet, die für die Repression durch Efg1p verantwortlich ist. Bei einem Sequenzvergleich dieser Region mit der *FLO1*-Promoter-Region stromaufwärts der ersten Deletion, konnte eine Sequenzen identifiziert werden, welche in beiden Regionen zu finden sind. Diese sechs Basenpaar lange Sequenz (ATGCAT) stellt ein Palindrom dar, und ist im *SAP2p* bei der Position -588 bp und -296 bp und im *FLO1p* bei -2125 bp und -417 bp zu finden. Das auffällige an dieser Sequenz ist, dass sie sehr ähnlich zu dem MCB-Element ist. Vier der sechs Nukleotide sind identisch mit der Sequenz des MCB-Elementes (ACGCGT). Lediglich das Cytosin an Position zwei und das Guanin an Position fünf sind gegen ein Thymin bzw. Adenin ausgetauscht. Ein Austausch dieser Nukleotide ist nicht sehr verwunderlich, da *C. albicans* mit 36,8 % einen geringeren GC-Gehalt aufweist als *S. cerevisiae* mit 39,7 % (Lloyd und Sharp, 1992). Bei der Analyse der Promotoren einiger anderer Efg1p-regulierter Gene, konnte diese MCB-ähnliche Sequenz (MLS) ebenfalls gefunden werden. So weisen beispielsweise der *PFK1p* bei -1546 bp, der *PFK2p* bei -915 bp und der *TPI1p* bei -1235 bp und -326 bp ein MLS-Element auf.

Neben diesem Element, welches die Efg1p-Repression vermittelt, scheint sich auch ein Element für eine Efg1p unabhängige Aktivierung zwischen den Nukleotiden -550 und -1050 zu befinden. Die Aktivität der kürzeren Promotorfusion müsste ansonsten eine vergleichbare Aktivität wie die längere Promotorfusion in der *efg1*-Mutante zeigen. Die Repression durch Efg1p erfolgt jedoch nicht über das MCB-Element, welches auch noch in der kürzeren Promotorfusion vorhanden ist. Auch die spezifischen Deletionen des MCB-Elementes zeigten keinen Einfluss auf die Regulation des *SAP2*-Promotors.

Da eine DNA-Bindung von Efg1p an den *SAP2*-Promotor durch ChIP-Analysen nicht gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist es wahrscheinlich, dass die Reprimierung durch Efg1p indirekt über ein anderes Protein erfolgt.

Die Promotorstudien des *FLO1* und *SAP2*-Promotors bestätigen die Ergebnisse aus den Transkriptomanalysen. Wie auch *Sok2p* besitzt Efg1p eine bivalente Funktion als Aktivator und als Repressor. Möglicherweise ändert sich das Verhalten von Efg1p je nach Bedingung und nach Aktivierung über die PKA. In parallelen Studien durchgeführte Ein-Hybrid-Experimente zeigten, dass Efg1p bei Rekrutierung an einen Promotor eine reprimierende Funktion besitzt (Al Brown, pers. Mitteilung). Diese reprimierende Funktion konnte in dieser Arbeit durch Fusionen von Efg1p an die Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsaktivators indirekt bestätigt werden. Es wurde deutlich, dass eine konstitutive aktivierende Funktion von Efg1p die Morphologie von *C. albicans* deutlich beeinflusst (siehe 3.12).

## 5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*, seine Wachstumsform reversibel an die Umweltbedingungen anzupassen, ist von entscheidender Bedeutung für seine Pathogenität. Das Wachstum als einzellige Hefezelle ermöglicht eine schnelle Vermehrung und Verbreitung im Wirt, während durch die Bildung von mehrzelligen Hyphen und Pseudohyphen die Adhäsion an Wirtsepithelien und deren Penetration erleichtert wird. Der Transkriptionsfaktor Efg1p ist ein zentraler Regulator dieser morphogenetischen Prozesse. Neben dem Dimorphismus beeinflusst er die Chlamydosporenbildung sowie den spontanen Phänotypwechsel zwischen der *white*- und der *opaque*-Form von *C. albicans*. In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Steuerung durch Efg1p und das kürzlich identifizierte homologe Protein Efh1p untersucht.

Um Zielgene von Efg1p und Efh1p zu identifizieren, wurden mit Hilfe der DNA-Microarray-Technologie genomweite Transkriptionsprofile von Mutanten und Überexpressionsstämmen beider Gene erstellt. Es zeigte sich, dass die *efh1*-Mutation, für die keine phänotypischen Merkmale bekannt sind, einen geringen Einfluss auf das Transkriptom ausübt. Die Überproduktion von Efh1p bewirkte hingegen signifikante Änderungen im Transkriptionsprofil, die ähnlich zu Änderungen bei Efg1p-Überproduktion waren. Die Einflüsse der *EFG1*- und *EFH1*-Überexpression auf das Transkriptom gingen mit den analogen Phänotypen einher. So induzierten beide Proteine bei Überproduktion die Bildung von Pseudohyphen, inhibierten die Ausbildung echter Hyphen und forcierten den Wechsel zur *white*-Form. Die ähnlichen Transkriptome der Überexpressionsstämme und die Abhängigkeit der Efh1p-vermittelten Pseudohyphenbildung von Efg1p lassen vermuten, dass der Einfluss von Efh1p auf das Transkriptom zumindest teilweise durch Efg1p vermittelt wird. Die Transkriptomanalysen der *efg1*-Mutanten zeigten, dass Efg1p überraschenderweise die Expression von vielen Genen reguliert, deren Genprodukte in den Kohlenstoffmetabolismus involviert sind. Gene des fermentativen Stoffwechsels werden durch Efg1p aktiviert, während die Gene des oxidativen Stoffwechsels reprimiert werden. Die Regulation einiger identifizierter Gene wurde durch Northern-Analysen und Reporterfusionen verifiziert. Anhand einer gesteigerten Antimycin A-Sensitivität der *efg1*-Mutante wurde die reduzierte glykolytische Aktivität der *efg1*-Mutante bewiesen. Somit koordiniert Efg1p Morphogenese und Metabolismus von *C. albicans*.

Der *EFG1*-Transkriptspiegel ist essentiell für die Morphogenese von *C. albicans*, da sowohl eine fehlende als auch eine unregulierte hohe *EFG1*-Expression die Ausbildung echter Hyphen unterdrückt. Eine homeostatische Regulation wird durch die autoregulatorische Repression des *EFG1*-Gens erreicht. Durch Chromatinimmunpräzipitations-Experimente konnte gezeigt werden, dass Efg1p einen Komplex mit der eigenen Promotorregion bildet. Die Repression des Promotors erfolgt vermutlich über die Rekrutierung des Sin3p-abhängigen-Histondeacetylase-Komplexes. Diese Vermutung wurde durch den Nachweis der Interaktion von Efg1p und Sin3p, wie auch durch Bindung von Sin3p an den *EFG1*-Promotor bestätigt.

Die Bindung von Efg1p und Efh1p an MCB-Elemente (ACGCGT) wurde untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass Efg1p, aber nicht Efh1p in der Lage ist, diese Sequenz *in vivo* zu binden. Durch spezifische Austausche konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäuren Threonin 248 und Arginin 262, innerhalb der APSES-Domäne von Efg1p, diese Bindung vermitteln. Die spezifische Deletion von MCB-Elementen in Promotoren von Efg1p-regulierten Genen hatte allerdings keinen Einfluss auf deren Regulation, so dass die Bedeutung der Efg1p-Bindung an MCB-Elemente offen bleibt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abi-Said, D. Anaissie, E., Uzun, O., Raad, I., Pinzcowski, H. und Vartivarian, S. (1997) The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.* **24**: 1122-1128
- Anderson, J.M. Cundiff, L., Schnars, B., Gao, M., Meckenzie, I. und Soll, D.R. (1989) Hyphae formation in the white-opaque transition of *Candida albicans* *Infect. Immun.* **57**: 458-467
- Anderson, J.M., Mihalik, K. und Soll, D.R. (1990) Ultrastructure of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque Phenotype. *J. Bacteriol.* **172**: 224-235
- Angiolella, L., Micocci, M.M., D'Alessio, S., Girolamo, A., Maras, B. und Cassone, A. (2002) Identification of major glucan-associated cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**: 1688-94
- Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R. und Metzberg, R. (1996) *Asm-1+*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* **3**: 991-1003
- Ayer, D.E., Lawrence, Q.A. und Eisenmann, R.N. (1995) Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* **80**: 767-776
- Beck-Sagué C.m. und Jarvis, W.R. (1993) Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990 *J. Infect. Dis.* **167**: 1247-1251
- Bensen, E.S., Filler, S.G. und Berman, J. (2002) A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **5**: 787-798
- Bennet, R.J. und Johnson, A.D. (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* **10**: 2505-2515
- Bennett, R.J., Uhl, M.A., Miller, M.G. und Johnson, A.D. (2003) Identification and Characterization of a *Candida albicans* Mating Pheromone. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8189-8201
- Bernstein, B.E., Tong, J.K. und Schreiber, S.L. (2000) Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13708-13713
- Beullens, M., Mbonyi, K., Geerts, L., Gladines, D., Detremere, K., Jans, A.W. und Thevelein, J.M. (1988) Studies on the mechanism of the glucose-induced cAMP signal in glycolysis and glucose repression mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 227-231
- Björck, L. und Kronvall, G. (1984) Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**: 969-974
- 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. und Ernst, J.F. (2001) A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* **157**: 1523-1530
- Bockmühl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. und 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. und 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.* **3**: 621-31

- Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R. und Senet, J.M. (1990) Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* **58**: 48-54
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54
- Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M. und Neeser, J.R. (1991) In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha1-2Gal beta bearing complex carbohydrates. *Infect. Immun.* **59**: 1605-1613
- Braun, B.R. und Johnson, A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor *TUPI*. *Science* **277**: 105-109
- Braun, B.R. und Johnson, A.D. (2000) *TUPI*, *CPHI* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**: 57-67
- Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X. und Kumamoto, C. (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol. Microbiol.* **34**: 651-662
- Buffo, J., Herman, M.A. und Soll, D.R. (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**: 21-30
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-78
- Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J.P., Odds, F.C. und Gow, N.A.R. (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7670-7675
- Calderone, R.A. und Braun, P.C. (1991) Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **55**: 1-20
- Calderone, R.A., und Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **7**: 327-335
- Cameron B.J., und Douglas, L.J. (1996) Blood group glycolipids as epithelial cells receptors for *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **64**: 891-896
- Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. und Shepherd, M.F. (1992) Cloning and expression of *Candida albicans* *ADE2* and proteinases genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 452-57
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. und Sudbery, P.E. (1999) The *Met3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* **34**: 792-98

- Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Basch, A., Sentandreu, R. und Martinez, J.P. (1992) Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **69**: 4221-29
- Cassone, A., Sullivan, P.A. und Sheperd, M.G. (1985) N-Acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiologica* **8**: 85-99
- Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B. und Entian, K.-D. (1999) The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 740-752
- Chen, J., Chen, J., Lane, S. und Liu, H. (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1335-1344
- Coukell, A.J. und Brogden, R.N. (1998) Liposomal Amphotericin B. *Drugs* **55**: 585-612
- Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. und White-way, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog, Cek1p, in Hyphal Development and Systemic Candidiasis. *Infect. Imm.* **66**: 2713-2721
- Cutler, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 187-218
- Davis, D., Edwards, J.E. Jr, Mitchell, A.P. und Ibrahim, A.S. (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* **10**: 5953-5959
- Delbrück, S., Sonneborn, A., Gerads, M., Grablowitz, A. und Ernst, J.F. (1997) Characterization and Regulation of the Genes Encoding Ribosomal Proteins L39 and S7 of the Human Pathogen *Candida albicans*. *Yeast* **13**: 1199-1210
- Doedt, T. (2000) Untersuchungen zur Regulation und DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors Efg1p aus *Candida albicans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Höner, C.B. und Hollenberg, C.P. (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-92
- Dohmen, R.J., Stappen, R., McGrath, J.P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. und Varshavsky, A. (1995) An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **270**: 18099-18109
- Dutton, J.R., Johns, S. und Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence specific transcription factor that regulates development complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **16**: 5710-5721
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. und Wenzel, R.P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 239-44
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. und Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genomw-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14863-14868
- Ellenberger, T. (1994) Getting a grip on DNA structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix loop helix DNA binding domains. *Curr. Op. Struct. Biol.* **4**: 12-21
- Ernst, J.F. (2000) Transcriptionfactors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiol.* **146**: 1763-1774
- Ernst, J.F. und Prill, S.K. (2001) O-glycosylation. *Med. Mycol.* **39**: 67-74

- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V. und Sentandreu, R. (1997) The highly immunogene enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* **149**: 313-320
- Escobar-Henriques, M., Daignan-Fornier, B. und Collart, M.A. (2003) The critical cis-acting element required for IMD2 feedback regulation GD pis a TATA box located 202 nucleotides upstream of the transcription start site. *Mol.Cell.Biol.* **17**: 6267-6278
- Facchini, L.M., Chen, S., Marhin, W.W., Lear, J.N., und Penn, L.Z. (1997) The Myc negative autoregulation requires Myc-Max association and involves the c-Myc P2 minimal promoter. *Mol. Cell.Biol.* **17**: 100-114
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H.C., Schafer, W. und Hube, B. (2002) *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* **7**: 3689-3700
- Ferre-d'Amare, A.R., Prendergast, G., Ziff, E.B. und Burley, S.K. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* **363**: 38-45
- Fidel, P., Vasquez, J.A., und Sobel, J.D. (1999) *Candida glabrata*: a review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 80-96
- Fonzi, W. und Irwin, Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728
- Fox, D. und Smulian, A.G. (2001) Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol.* **6**: 495-507
- Fraser, V.J., Jones, M., Dunkel, J., Storfer, S., Medoff, G. und Dunagan, W.C. (1992) Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 414-421
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W. Ramos, C.F. und Ghannoum, M.A. (1999) Expression of the *Candida albicans* gene *ALSI* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**: 1783-1786
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G. und 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
- Gadsden, M.H., Mc Intosh, E.M., Game, J.C., Wilson, P.J. und Haynes, R.H. (1993) dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Sacharomyces cerecvisiae*. *EMBO J* **12**: 4425-4431
- Gale, C.A., Finkel, D., Tao, N., Meinke, M., McClellan, M., Olson, J., Kendrick, K. und Hostetter, M.K. (1996) Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *C. albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 357-361
- Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J.M., Berman, J. und Hostetter, M.K. (1998) Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, INT1. *Science* **279**: 1355-1358
- Gale, C., Gerami-Nejad, M., McClellan, M., Vandoninck, S., Longtine, M.S. und Berman, J. (2001) *Candida albicans* Int1p interacts with the septinring in yeast and hyphal cells. *Mol. Biol. Cell* **11**: 3538-3549

- Gerami-Nejad, M., Berman, J. und Gale, C.A. (2001) Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast* **9**: 859-864
- Ghannoum, M.A. und Rice, L.B. (1999) Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanism of Resistance and Correlation of these Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**: 501-517
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 122-143
- Gimeno, C.J. und Fink, G.R. (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2100-2112
- Giusani, A.D., Vences, M. und Kumamoto, C.A. (2002) Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* **4**: 1749-1753
- Golemis, E.A. und Khazak, X. (1994) Alternative yeast two-hybrid system: The interaction trap and interaction mating. *Methods in Molecular Biology*, Chapter 60
- Gow, N.A. (1997) Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr. Top. Med. Mycol.* **8**: 43-55
- Graham, J.E. und Clark-Curtiss, J.E. (1999) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11554-11559
- Greenspan, D. und Greenspan, J.S. (1996) HIV-related oral disease. *Lancet* **348**: 729-733
- Groll, A.H., De Lucca, A.J. und Walsh, T.J. (1998) Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.* **6**: 117-24
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hendrick, J.L., Wilson, P.G., Edelman, I.I., Sandbanken, M.G., Ursic, D. und Culbertson, M.R. (2001) Yeast frameshift suppressor mutations in the gene coding for transcription factor Mbflp and ribosomal protein S3. Evidence for autoregulation of  $\beta$ 3 synthesis. *Genetics* **157**: 1141-1158
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev. Biochem.* **67**: 425-479
- Hostetter, M.K. (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 29-42
- Hoyer, L.L. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **4**: 176-180
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R. (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **14**: 87-99
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R. (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes, *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *C. albicans albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* **65**: 3529-38
- Hull, C. M. und Johnson, A. D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**: 1271-1275

- Hull, C. M., Raisner, R. M. und Johnson, A. D. (2000) Evidence for mating of the 'asexual' yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **189**: 307-310
- Hwang, C.S., Oh, J.H., Huh, W.K., Yim, H.S. und Kang, S.O. (2003) Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1029-1043
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. und Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* **98**: 4569-4574
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient Two-Hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-36
- Jiang L, Whiteway M. und Shen, S.H. (2001) A novel type 2C protein phosphatase from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *FEBS Lett* **1**: 142-144
- Johnston, L.H. und Lowndes, N.F. (1992) Cell Cycle control of DNA synthesis in budding yeast. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 2403-2410
- Jong, A.Y., Chen, S.H., Stins, M.F., Kim, K.S., Tuan, T.L. und Huang, S.H. (2003) Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**: 615-622
- Joshi, K.R., Solanki, A. und Prakash, P. (1993) Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Pathol. Microbiol.* **36**: 48-52
- Jung, W.H. und Stateva, L.I. (2003) The cAMP phosphodiesterase encoded by *PDE2* is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology* **10**: 2961-2976
- Kadosh, D. und Struhl, K. (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **3**: 365-371
- Kadosh, D. und 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.* **7**: 2496-2505
- Kaiser, B., Kunkel, B., Saluz, H.P. und Munder, T. Identification of *Candida Albicans* protein domains with transcriptional activating properties in *Saccharomyces cerevisiae*. Genbankentry CAA07164-CAA07172
- Kao, A.S. Brandt, M.E., Pruitt, W.R., Conn, L.A., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Baughmann, W.S., Reingold, A.L., Rothrock, G.A., Pfaller, M.A., Pinner, R.W., und Hajjeh, R.A. (1999) The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population based active surveillance. *Clin. Infec. Dis.* **29**: 1164-1170
- Kelly, R., Miller, S.M., Kurtz, M.B. und Kirsch, D.R. (1987) Directed mutagenesis in *Candida albicans*: One-step gene disruption to isolate *ura3*-mutants. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 199 – 207
- Kennedy, P.J., Rogers, A.L., Hanselman, L.R., Soll, D.R. und Yancey, R.J. (1988) Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotype. *Mycopathologia* **102**: 149-156
- Khalaf, R.A. und Zitomer, R.S. (2001) The DNA binding protein Rfg1 is a repressor of filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **4**: 1503-1512
- Koch, C., Moll, T., Neuberger, M., Ahorn, H. und Nasmyth, K. (1993) A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* **261**: 1551-1557
- Koch, C. und Nasmyth, K. (1994) Cell cycle transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**: 451-459

- Korting, H.C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C. und Schaller, M. (2003) Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J. Med. Microbiol.* **52**: 632-32
- Köhler, J. und Fink, G.R. (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 13223-13228
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., Winde, J.H. und Thevelein, J.M. (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* **32**: 1002-1012
- Krieger, K. und Ernst, J.F. (1994) Iron regulation of triosephosphat isomerase transcript stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**: 1079-1084
- Kubler, E., Mosch, H.U., Rupp, S. und Lissanti, M.P. (1997) Gpa2, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 20321-20323
- Kumamoto, C.A. (2002) *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* **6**: 608-611
- Kurdistani, S.K., Robyr, D., Tavazoie, S. und Grunstein, M. (2002) Genome wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. *Nat. Genet.* **31**: 248-254
- Kurdistani, S.K. und Grunstein, M. (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 276-284
- Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W., Miller, S.M., Lai, M. und Kirsch, D.R. (1987) Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 209-217
- Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J. und Soll, D.R. (2003) Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect. Immun.* **9**: 4970-4976
- 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. und Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **23**: 14907-14912
- Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. und Liu, H. (2001a) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via *TECI*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 6418-6428
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R. und Liu, H. (2001b) DNA Array Studies Demonstrate Convergent Regulation of Virulence Factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **52**: 48988-48996

- Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L. und Friedman, L. (1975) Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: Relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. *Infect. Immun.* **11**: 1014-1023
- Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A.R., Brown, A.J.P. und Thomas, D.Y. (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and the Ste7p protein kinase can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 13217-13222
- Ledent, V. und Vervoort, M. (2001) The basic helix-loop-helix-Protein-Family: Comparitiev Genomics and Phylogenetic Analysis. *Gen. Res.* **11**: 754-770
- Leng, P., Lee, P.R., Wu, H und Brown, A.J.P. (2001) Efg1, a Morphogenetic Regulator in *Candida albicans*, Is a Sequence-Specific DNA Binding Protein. *J. Bacteriol.* **183**: 4090-4093
- Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1994) Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 212-217
- Leuker, C.E., Sonneborn, A., Delbrück, S. und J.F. Ernst (1997) Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolcarboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* **192**: 235-240
- Li, L., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D. und Ziff, E.B. (1994) c-Myc represses transcription *in vivo* by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J* **13**: 4070-4079
- Liu, H., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1993) Elements of the Yeast Pheromone Response Pathway Required for Filamentous Growth of Diploids. *Science* **262**: 1741-1744
- Liu, H., Köhler, J. und Fink, G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723-1725
- Lloyd, A.T. und 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.-S., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-49
- Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A. und Soll, D.R. (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **2**: 737-745
- Lockhart, S.R., Zhao, R., Daniels, K.J. und Soll, D.R. (2003) alpha-Pheromone-Induced "Shmooing" and Gene Regulation Require White-Opaque Switching during *Candida albicans* Mating. *Eukaryot Cell* **5**: 847-855
- Lorberg, A., Kirchrath, L., Ernst, J.F. und Heinisch, J.J. (1999) Genetic and biochemical characterization of phosphofructokinase from the opporunistic pathogen *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* **260**: 217-226
- Lorenz, M.C. und Fink, G.R. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**: 83-86
- Lorenz, M.C. und Fink, G.R. (2002) Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryotic Cell* **1**: 657-662
- Losberger, C. und Ernst, J.F. (1989) Sequence and transcript analysis of the *C. albicans* gene (*URA3*) encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr. Genet.* **16**: 153-157

- Lowndes, N.F., Johnson, A.L., Breeden, L. und Johnston, L.O. (1992) Swi6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature* **357**: 505-508
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H. und Pabo, C.O. (1994) Crystal structure of MyoD bHLH domain DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* **77**: 451-459
- Magee, B. B. und Magee, P. T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by the construction of *MTLa* and *MTL $\alpha$*  strains. *Science* **289**: 310-313
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M. und Magee, P.T. (2002) Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1345-1351
- Marr, K.A., Seidel, K., White, T.C. und Bowden, R.A. (2000) Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J. Infect. Dis.* **181**: 309-316
- Mason, A.B., Buckley, H.R. und Gorman, J.A. (1993) Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene. *J. Bacteriol.* **9**: 2632-2369
- McCullough, M.J., Ross, B.C. und Reade, P.C. (1996) *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiologic, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **25**: 136-144
- McIntosh, E. (1993) MCB elements and the regulation of DNA replication genes in yeast. *Curr. Genet.* **24**: 185-192
- McIntosh, E.M., Looser, J., Haynes, R.H. und Pearlman, R.E. (1994) *MluI* site dependent transcriptional regulation of the *Candida albicans* dUTPase gene. *Curr. Genet.* **26**: 415-421
- Miller, J. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1, 1-11
- Miller, K.Y., Wu, J. und Miller, B.L. (1992) StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes and Development* **6**: 1770-1782
- Miller, M.G. und Johnson, A.D. (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **3**: 293-302
- Mizushima, N., Noda, T. und Ohsumi, Y. (1999) Agp16p is required for the function of the Agp12p-Agp5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* **18**: 3888-3896
- Moks, T., Abrahamsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjöquist, J. und Uhlen, M. (1986) Staphylococcal Protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.* **156**: 637-643

- Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. und Shepherd, M.G. (1994) Purification and characterization of two forms of N-Acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outerchain glycosylation. *Microbiology* **140**: 1543-1553
- Montezari, M. und Hedrick, H.G. (1984) Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1341-1342
- Morschhäuser, J., Blum-Oehler, G. und Jacker, J. (1997) Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies. *Med. Welt* **48**: 352-357
- Morschhäuser, J., Michel, S. und Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **32**: 547-556
- Müller, H., Ziegler, B. und Schweizer, B. (1993) UV/VIS-Spektroskopie in der Nucleinsäureanalytik. *BioTec.* **4**: 25-29
- Mullis, K.B. und Fallona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350
- Murad, A.M.A., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S. und MacCallum, D. (2001a) *NRG1* represses yeast-hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20**: 4742-4752
- Murad, A.M.A., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tourneau, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. und Brown, A.J.P. (2001b) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol. Microbiol.* **42**: 981-993
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.M., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H. und Baltimore, D. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**: 437-445
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J. und Hube, B. (2003a) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **3**: 400-428
- Naglik, J.R., Rodgers, C.A., Shirlaw, P.J., Dobbie, J.L., Fernandes-Naglik, L.L., Greenspan, D., Agabian, N. und Challacombe, S.J. (2003b) Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl protein and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J. Infect. Dis.* **3**: 469-479
- Nair, M., McIntosh, P.B., Frenkiel, T.A., Kelly, G., Taylor, I.A., Smerdon, S.J. und Lane, A.N. (2003) NMR structure of the DNA-binding domain of the cell cycle protein Mbp1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **5**: 1266-73
- Nantel, A.; Dignard, D.; Bachewich, C.; Marcus, D.; Marcil, A.; Bouin, A.; Sensen, C.; Hogues, H.; Hoog, M.; Gordon, P.; Rigby, T.; Benoit, F.; Tessier, D.; Thomas, D. und Whiteway, M. (2002) Transcript Profiling of *Candida albicans* Cells undergoing the Yeast-to-Hyphal-Transition. *Mol. Biol. Cell* **13**: 3452-3465
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. und Aoki, Y. (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **68**: 6712-9

- Nasi, S., Ciarapica, R., Jucker, R., Rosati, J. und Soucek, L. (2001) Making decisions through Myc. *FEBS Lett* **490**: 153-162
- Niewerth, M. und Korting, H.C. (2001) Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* **44**: 361-367
- Odds, F.C. (1988) *Candida* and candidosis. 2<sup>nd</sup> ed., London: Bailliere Tindall
- Odds, F.C. (1994) Pathogenesis of *Candida* infections. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 31, 2-5
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. und Dang, C.V. (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-myc. *J. Biol. Chem.* **29**: 21797-21800
- Petersen, R.F., Marinoni, G., Nielsen, M.L. und J. Piskur (2000) Molecular Approaches for Analyzing Diversity and Phylogeny among Yeast Species., in: *Contributions to Microbiology 5: Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts* 15-35. Hrsg. J.F. Ernst und A. Schmidt, Basel: Karger
- Pfaller, M.A., Jones, R., Doern, G., Fluit, A. Verhoef, J., Sader, H., Messer, S., Houston, A. Coffmann, S. und 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
- Pitarch, A., Diez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sanchez, M., Gil, C. und Nombela, C. (2001) Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics* **4**: 550-559
- Pringle, J.R. (1991) Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol* **194**: 732-735
- Prigneau, O., Porta, A., Poudrier, J., Colonna-Romano, S., Noel, T. und Maresca, B. (2003) Genes involved in  $\beta$ -oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast* **20**: 723-730
- Rademacher, F. (1998) Chaperonine als dominant-negative Suppressoren von Ras-Phänotypen und der Morphogenese von *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertaion, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Ramanan, N. und Wang, Y. (2000) A high-affinity Iron Permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* **288**: 1062-1064
- Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. und Kumamoto, C. (1999) Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect. Imm.* **67**: 3649-3652
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. und Fink, G.R. (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5984-5988
- Robinson, K.A. und Lopes, J.M. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* basic helix loop helix proteins regulate diverse biological processes. *Nuc. Acids. Res.* **28**: 1499-1505

- Rocha, C.R.C., Schröppel, K., Marcus, D., Marciel, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M. und 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
- Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P. und Fink, G.R. (2003) Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11007-11012
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press NY.
- Sanchez-Martinez, C. und Perez-Martin, J. (2002) Gpa2, a G-Protein  $\alpha$  Subunit required for hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **1**: 865-874
- Santos, M.A.S. und Tuite, M.F. (1995) The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1481-86
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C. und Lopez-Ribot, J.L. (2003) Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell* **5**: 1053-1060
- Schaller, M., Schäfer, W., Korting, H.C. und Hube, B. (1998) Differential expression secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol. Microbiol.* **29**: 605-615
- Schaller, M., Korting, H.C., Schafer, W., Bastert, J., Chen, W. und Hube, B. (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* **1**: 169-180
- Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E. und Hube, B. (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **114**: 712-717
- Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B. und Korting, H.C. (2001) Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. *J. Med. Microbiol.* **50**: 743-747
- Schaller, M., Bein, M., Korting, H.C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S. und Hube, B. (2003) The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect. Immun.* **6**: 3227-3234
- Schüller, H.J., Hahn, A., Troster, F., Schutz, A. und Schweitzer, E. (1992) Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes FAS1 and FAS2 by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *EMBO J* **11**: 107-114
- Schuettengruber, B., Simboeck, E., Khier, H. und Seiser, C. (2003) Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression. *Mol.Cell.Biol.* **19**: 6993-7004
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. und Schröppel, K. (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **3**: 435-445
- Schwienhorst, I., Johnson, E.S. und Dohmen, R.J. (2000) SUMO conjugation and deconjugation. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 771-786

- Shenhar, G. und Kassir, Y. (2001) A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1603-1612
- Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1986) Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbour Laboratory press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sherwood, J., Gow, N.A., Gooday, G.W., Gregory, D.W. und Marshall, D. (1992) Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 461-469
- Skerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T. und Scheld, W.M. (1984) *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can. J. Microbiol.* **30**: 221-27
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. und Soll, D.R. (1987) „White-opaque transition“: a second high frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**: 189-197
- Smith, A., Ward, M.P. und Garret, S. (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J* **17**: 3556-3564
- Sobel, J.D. (1997) Vaginitis *N. Engl. J. Med.* **337**: 1896-1903
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H. und Rupp, S. (2003) *EFG1* is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol. Microbiol.* **47**: 89-102
- Soll, D.R., Anderson, J. und Bergen, M. (1991) The development biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*. In the Molecular Biology of *Candida albicans*, pp. 20-45; Prasad, R.; Springer, Berlin
- Soll, D.R., Morrow, B. und T. Srikantha (1993) High-frequecy phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**: 61-65
- Sonneborn, A. (1999) Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Efg1p und der Proteinkinase A (CaTPK2p) für die Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P. und Ernst, J.F. (1999a) Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* **67**: 5514-5517
- Sonneborn, A., Tebarth, B. und Ernst, J.F. (1999b) Control of white-opaque switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect. Immun.* **67**: 4655-4660
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. und Ernst, J.F. (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Micobiol.* **35**: 386-396
- Srikantha, T. und Soll, D.R. (1993) A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* **131**: 53-60
- Srikantha, T., Morrow, B., Schroppel, K. und Soll, D.R. (1995) The frequency of integrative transformation at phase specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 342-52
- Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K. und Soll, D.R. (2000) *EFG1* null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J. Bacteriol.* **6**: 1580-1591

- Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L. und Sundstrom, P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1p *Science* **283**: 1535-1538
- Stempel, C. (2003) Untersuchungen zur Funktion von Efh1p, eines Homologen des Efg1-Regulatorproteins von *Candida albicans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Strickling, B. (1996) Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsfaktors Hyd1p (Efg1p) aus dem pathogenen Pilz *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Suckow M. und Hollenberg, C.P. (1998) The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p *in vivo* can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **276**: 887-902
- Sudbbery, P.E. (2001) The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol.* **41**: 19-31
- Sundstrom P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol.* **8**: 461-469
- Sweet, S.P. und Douglas, L.J. (1991) Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 859-66
- Tebarth (2001) Regulation der Expression des *EFG1*-Gens in der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Tebarth, B.; Doedt, T. Krishnamurthy, S.; Weide, M.; Monterola, F., Dominguez, A. und 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
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J.F. (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 20837-20846
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- Treitel, M.A. und Carlson, M. (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3132-3136
- Tusher, V.G., Tibshirani, R. und Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 5116-5121
- Ushinsky, S.C., Marcus, D., Ash, J., Dignard, D., Marcil, A., Morchhauser, J., Thomas, D.Y., Whiteway, M. und Leberer, E. (2002) *CDC42* is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **1**: 95-104
- Vasquez-Torres, A. und Balish, E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 170-192
- Vermeersch, B., Rysselaere, M., Dekeyser, K., Rasquin, K., De Vos, M., Elewaut, A. und Barbier, F. (1989) Fungal colonization of the esophagus. *Am J. Gastroenterol.* **84**: 1079-1083
- Viera, J. und Messing, J. (1991) New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* **100**: 189-194

- Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Lebau, B., Spence, D., Krcmery, V., De Pauw, B. und Meunier, F. (1999) Candidemia in cancer patients. A prospective, multicenter surveillance study in Europe by the Invasive Fungal Infection Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Clin. Infect. Dis.* **28**: 1071-1079
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R. und Garret, S. (1995) *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6854-6863
- Watari, J., Takata, Y., Ohawa, M., Sahara, H., Koshino, S., Onnela, M.L., Airaksinen, U., Jaatinen, R., Penttila, M. und Keranen, S. (1994) Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast* **10**: 211-225
- Watts, H.J., Very, A.A., Perera, T.H., Davies, J.M. und Gow, N.A. (1998) Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* **3**: 689-695
- Weide, M.R. und Ernst, J.F. (1999) Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycoses* **42**: 61-67
- White, T.C., Marr, K.A. und Bowden, R.A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 382-402
- Whiting, G.C., Evans, J.T., Patel, S., Gillespie, S.H. (2002) Purification of native alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae* that binds plasminogen and is immunogenic. *J Med Microbiol.* **10**: 837-843
- Wilson, R.B., Davis, D. und Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J. Bacteriol.* **181**: 1868-74
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-78
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119
- Zaragoza, O., Rodriguet, C. und Gancedo, C. (2000) Isolation of the *MIG1* gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J. Bacteriol.* **182**: 320-326
- Zhou, P. und Thiele, D.J. (1993) Rapid transcriptional autoregulation of a yeast metalloregulatory transcription factor is essential for high-level copper detoxification. *Genes and Development.* **7**: 1824-1835
- Zink, S., Nass, T., Rosen, P. und Ernst, J.F. (1996) Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers *Infect. Immun.* **12**: 5085-5091

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	kDa	Kilodalton
μ	mikro	<i>LAC4</i>	β-Galaktosidase-Gen aus <i>K. lactis</i>
A	Adenin	<i>LacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>
Abb.	Abbildung	LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
Ac	Acetat	log	logarithmisch
AD	Aktivierungsdomäne	M	Molar
Amp	Ampicillin	mA	Milliampere
AP	Alkalische Phosphatase	MAP	mitogen activated protein
APS	Ammoniumpersulfat	MCB	<i>MluI</i> cell cycle box
<i>ARS</i>	Autonom replizierende Sequenz	MCS	multiple cloning site
AS	Aminosäure	min	Minuten
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	ml	Milliliter
b (bp)	Basen (Basenpaare)	mM	Millimolar
BD	DNA-Bindedomäne	MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
bHLH	basic Helix-Loop-Helix	mRNA	messenger RNA
bidest.	bidestilliert	nm	Nanometer
BSA	Rinderserumalbumin	NP40	Nonidet P40
bzw.	beziehungsweise	OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei λ = x nm
C	Cytosin	ONPG	o-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	ORF	offener Leserahmen
CASA	Casaminosäuren	PAA	Polyacrylamid
cDNA	komplementäre DNA	PBS	Phosphate buffered saline
<i>CEN</i>	Centromer	<i>PCK1p</i>	<i>PCK1</i> -Promotor
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	PCR	'polymerase chain reaction'
C-Quelle	Kohlenstoffquelle	PEG	Polyethylenglycol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PKA	Proteinkinase A
DMF	Dimethylformamid	PMSF	Phenylmethyl-Sulfonyl Fluorid
DMSO	Demethylsulfoxid	POD	Peroxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PVDF	Polyvinyliden Fluorid
dNTP	Desoxinukleotid	RLU	relative Lichteinheiten
DTT	1,4-Dithiothreitol	RNA	Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	mRNA	messenger RNA
Efg1p	Efg1-Protein	rRNA	ribosomale RNA
Efh1p	Efh1-Protein	RT	Raumtemperatur
Fa.	Firma	s	Sekunde
FDR	false discovery rate	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
g	Gramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
G	Guanin	ss	Einzelstrang
ggf.	gegebenenfalls	SSC	standard saline citrate
h	Stunde	β-Gal	β-Galaktosidase
HA	Hämagglutinin	SSPE	saline sodiumphosphat-EDTA
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure		
IP	Immunpräzipitation		
kb	Kilobasenpaare		

---

T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- 1,3-propandiol
u	units
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D- galactopyranosid
YCB	Yeast carbon base
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
WT	Wildtyp
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

## 8 Anhang

Tab. 15: Regulierte Gene in der *efg1* Mutante HLC52 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (283 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 0.95 %). Die Zellen wurden in YPD-Medium bei 30°C angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Citratzyklus</b>				
<i>ACC1</i>	CA5816	acetyl-coenzyme-A carboxylase	1.5	0.12
<i>ACH1</i>	CA0345	acetyl-coenzyme-A hydrolase	2.3	0.12
<i>FUM12.3F</i>	CA4351	Fumarate hydratase, 3-prime end	3.1	0.12
<i>FUM12.5F</i>	CA4349	Fumarate hydratase, 5-prime end	2.1	0.12
<i>GDH3</i>	CA1579	NADP-glutamate dehydrogenase	2.5	0.12
<i>IPF4401</i>	CA0903	Succinate dehydrogenase	1.7	0.12
<i>KGD1</i>	CA3149	2-oxoglutarate dehydrogenase	2	0.12
<i>MDH1</i>	CA5164	Mitochondrial malate dehydrogenase precursor	1.6	0.12
<i>SDH12</i>	CA2470	Succinate dehydrogenase	1.5	0.12
<b>Atmung</b>				
<i>ATP1.EXON3</i>	CA4457	F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit, exon 3	1.6	0.12
<i>ATP17.3</i>	CA5852	F1F0-ATPase complex, F1 delta subunit	1.6	0.75
<i>STF2</i>	CA2738	ATP synthase regulatory factor	2.5	0.12
<i>NUBM</i>	CA2326	nucleotide-binding respiratory complex I subunit	1.6	0.12
<i>PET9</i>	CA5388	ADP/ATP carrier protein	1.6	0.12
<b>Histone</b>				
<i>HHF21</i>	CA2862	histone H4	2	0.12
<i>HHF22</i>	CA3372	histone H4	3	0.12
<i>HHT21</i>	CA2861	Histone H3	2	0.12
<i>HTA3</i>	CA3382	histone H2A F/Z variant	1.5	0.12
<i>HTB1</i>	CA4697	Histone H2B	2	0.12
<b>Zellwand</b>				
<i>IPF10153</i>	CA3747	membrane transporter	1.5	0.12
<i>ECM29.EXON2</i>	CA5930	Involved in cell wall biogenesis and architecture	1.7	0.12
<i>ECM14</i>	CA2407	carboxypeptidase involved in cell wall biogenesis and architecture	1.6	0.12
<b>Ribosomale Proteine</b>				
<i>MRPL16</i>	CA0910	ribosomal protein	1.6	0.12
<i>MRPL49</i>	CA4434	ribosomal protein mitochondrial	1.5	0.12
<i>MRPS5</i>	CA3526	probable ribosomal protein S5, mitochondrial	2.6	0.53
<i>RPS26A</i>	CA4534	ribosomal protein S26.e.A, cytosolic	2	0.12
<i>YST1.EXON2</i>	CA5021	Ribosomal protein, exon 2	1.6	0.12
<b>Transcriptionfaktoren</b>				
<i>CAP1</i>	CA2614	transcriptional activator	1.9	0.20
<i>CTA21</i>	CA2615	transcriptional activation	1.9	0.12
<i>CTA24</i>	CA2495	transcriptional regulation	1.8	0.12
<i>CTA241.EXON1</i>	CA4358	transcriptional activator, exon 1	2.1	0.12

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

<i>CTA241.EXON2</i>	CA0183	transcriptional activator, exon 2	2.1	0.12
<i>CTA26</i>	CA6059	transcriptional activation	1.9	0.12
<i>IPF6067</i>	CA3851	putative transcription factor	1.6	0.12
<b>Stressproteine</b>				
<i>SOD22.3F</i>	CA5588	superoxide dismutase, 3-prime end	1.6	0.12
<i>SSC1</i>	CA4474	mitochondrial heat shock protein 70-related protein	1.9	0.12
<i>YHB1</i>	CA0943	flavo-hemoglobin	2.9	0.12
<b>Formatdehydrogenasen</b>				
<i>FDH12</i>	CA1846	formate dehydrogenase	2.1	0.12
<i>FDH3.3F</i>	CA1253	formate dehydrogenase, 3-prime end	1.5	0.12
<i>FDH4.3F</i>	CA0636	formate dehydrogenase, 3-prime end	1.5	0.60
<b>Unbekannte und unklassifizierte</b>				
<i>AMD1</i>	CA4680	AMP deaminase	1.5	0.12
<i>ARO8</i>	CA4804	aromatic amino acid aminotransferase I	1.6	0.12
<i>CDC55</i>	CA4535	B subunit of protein phosphatase 2A	1.8	0.12
<i>CDR11.3F</i>	CA0609	multidrug resistance protein, 3-prime end	1.6	0.12
<i>CDR3.5EOC</i>	CA1545	ABC transporter, multidrug resistance protein	1.5	0.26
<i>CHA12</i>	CA3945	L-serine/L-threonine deaminase	1.7	0.12
<i>CTR1</i>	CA1496	copper transport protein	1.5	0.12
<i>FAS2.3F</i>	CA6107	fatty-acyl-CoA synthase, alpha chain, 3-prime end	1.8	0.12
<i>FBP1</i>	CA3199	fructose-1,6-bisphosphatase	1.5	0.75
<i>FTR1</i>	CA5345	high affinity iron permease	1.8	0.12
<i>GCV2</i>	CA3883	glycine decarboxylase P subunit	1.6	0.12
<i>HRP1</i>	CA6073	nuclear polyadenylated RNA-binding protein	1.7	0.26
<i>IPF10138.3F</i>	CA1355	unknown function	1.9	0.12
<i>IPF10138.5F</i>	CA1356	unknown function	1.8	0.12
<i>IPF11</i>	CA6074	unknown function	1.7	0.26
<i>IPF1164</i>	CA4810	Subunit NUHM	1.5	0.12
<i>IPF11936.3F</i>	CA3701	unknown function	1.5	0.12
<i>IPF1210</i>	CA4829	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NFU1	2	0.12
<i>IPF12316</i>	CA1098	unknown function	1.7	0.12
<i>IPF1239</i>	CA0077	unknown function	1.6	0.12
<i>IPF1292</i>	CA5678	unknown function	1.9	0.12
<i>IPF13319</i>	CA1088	unknown function	1.8	0.12
<i>IPF13943</i>	CA5012	Unknown function	1.6	0.41
<i>IPF14285</i>	CA1962	unknown function	1.8	0.12
<i>IPF14895</i>	CA1987	unknown function	2	0.12
<i>IPF17790</i>	CA0030	unknown function	1.8	0.12
<i>IPF2431</i>	CA5714	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tsa1p	1.7	0.12
<i>IPF2441</i>	CA5719	unknown function	1.6	0.26
<i>IPF2690.3F</i>	CA5812	unknown function	2.1	1.04
<i>IPF2795</i>	CA5936	unknown function	1.5	0.12
<i>IPF3309.3EOC</i>	CA5696	unknown function	1.7	0.12
<i>IPF3503</i>	CA5952	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fcp1p	1.7	0.12
<i>IPF3810</i>	CA2784	unknown function	1.8	0.12
<i>IPF4229</i>	CA4695	unknown function	1.5	0.20
<i>IPF4835</i>	CA6071	zinc finger protein	1.6	0.12
<i>IPF5457</i>	CA2609	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sec28p	2.5	0.12
<i>IPF5471</i>	CA2603	unknown function	1.5	0.12
<i>IPF5915</i>	CA0670	phosphatidyl synthase	1.8	0.12
<i>IPF5987</i>	CA5544	unknown function	1.6	0.12
<i>IPF6003</i>	CA1345	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Msb2p	1.5	0.20
<i>IPF6505</i>	CA3973	unknown function	1.6	0.12
<i>IPF66</i>	CA6100	unknown function	2	0.12

<i>IPF7141</i>	CA3986	unknown function	1.9	0.12
<i>IPF7377</i>	CA3750	unknown function	1.5	0.12
<i>IPF8179</i>	CA3836	putative esterase	3.1	0.75
<i>IPF9251</i>	CA3639	unknown function	2	0.12
<i>IPF9401</i>	CA5395	unknown function	1.6	0.12
<i>IPF9632</i>	CA3167	unknown function	1.5	0.20
<i>KIP3</i>	CA5651	kinesin-related protein required for nuclear migration	2.1	0.75
<i>NCE102</i>	CA6097	secretion of proteins that lack classical secretory signal sequence	2	0.12
<i>NRD1</i>	CA3436	involved in regulation of nuclear pre-mRNA abundance	1.7	0.12
<i>PHO87.5EOC</i>	CA0015	member of the phosphate permease family, 5-prime end	1.6	0.12
<i>QCR9</i>	CA0376	ubiquinol--cytochrome-c reductase subunit 9	1.6	0.12
<i>RDH54</i>	CA5519	helicase required for mitotic diploid-specific recombination and repair	2	0.53
<i>RGA2</i>	CA5154	rho-GTPase activating protein 2	1.9	0.60
<i>RPS620A</i>	CA3267	unknown function	2.7	0.12
<i>RPS620B</i>	CA3268	unknown function	3.4	0.12
<i>TIM54</i>	CA3631	translocase for the insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane	1.5	0.26
<i>UBI4</i>	CA5932	polyubiquitin	1.8	0.12
<i>YTA12</i>	CA4838	protease of the <i>SEC18/CDC48/PAS1</i> family of ATPases (AAA)	1.6	0.12

## Herunterregulierte Gene

### Glykolyse

<i>ENO1</i>	CA3874	enolase I	0.66	1.04
<i>FBA1</i>	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase	0.37	0.12
<i>GLK1</i>	CA0263	aldohexose specific glucokinase	0.40	0.12
<i>GPM1</i>	CA4671	phosphoglycerate mutase	0.40	0.12
<i>PFK1</i>	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	0.46	0.12
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0.41	0.12
<i>PGII</i>	CA3559	glucose-6-phosphate isomerase	0.50	0.12
<i>TPI1</i>	CA5950	triose phosphate isomerase	0.44	0.12
<i>HXK2.3F</i>	CA0127	hexokinase II, 3-prime end	0.36	0.12

### Reservekohlenhydrat-Stoffwechsel

<i>TPS2</i>	CA5066	threose-6-phosphate phosphatase	0.45	0.12
<i>TPS3.3</i>	CA5505	trehalose-phosphate synthase, regulatory subunit	0.41	0.12
<i>IPF8321</i>	CA2938	Similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Glg2p	0.41	0.12
<i>GSY1</i>	CA5467	glycogen synthase	0.45	0.12
<i>GPH1</i>	CA5206	glycogen phosphorylase	0.35	0.12

### Metabolismus

<i>ADH1</i>	CA4765	alcohol dehydrogenase	0.48	0.12
<i>ADH4</i>	CA2333	alcohol dehydrogenase	0.52	0.60
<i>DAK2.3EOC</i>	CA0311	dihydroxyacetone kinase, 3-prime end	0.45	0.12
<i>GPD1</i>	CA2263	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.55	0.12
<i>GPD2</i>	CA0824	glycerol 3-phosphate dehydrogenase	0.38	0.12
<i>PDC11</i>	CA2474	pyruvate decarboxylase	0.63	0.12

### Transporter und Zellwand

<i>AGP3</i>	CA1525	amino acid-permease	0.59	0.12
<i>BPT1.3F</i>	CA3544	membrane transporter of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, 3-prime end	0.61	0.20
<i>BPT1.5F</i>	CA3545	membrane transporter of the ATP-binding cassette	0.60	0.26

		(ABC) superfamily, 5-prime end		
<i>DUR35.3F</i>	CA6133	urea transport protein, 3-prime end	0.48	0.75
<i>IPF1954</i>	CA5295	putative transporter	0.35	0.20
<i>IPF5185 (FLO1)</i>	CA1678	putative cell wall protein	0.20	0.12
<i>STL1</i>	CA0472	sugar transporter	0.66	0.26
<b>Fettsäuremetabolismus</b>				
<i>ERG13</i>	CA5549	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	0.62	0.12
<i>ERG251</i>	CA0875	C-4 sterol methyl oxidase	0.51	0.12
<i>SUR2</i>	CA2225	hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide	0.28	0.12
<b>Stressproteine</b>				
<i>HSP12</i>	CA0627	heat shock protein	0.56	0.12
<i>RHR2</i>	CA5788	DL-glycerol phosphatase	0.23	0.12
<i>SSA4</i>	CA1230	Cahsp70 mRNA for heat shock	0.55	0.12
<i>IPF13836</i>	CA2342	probable heat shock protein	0.66	0.12
<b>Unbekannte und unklassifizierte</b>				
<i>CAF16</i>	CA3880	ABC ATPase	0.57	0.12
<i>CBK1</i>	CA2022	serine/threonine protein kinase	0.62	0.12
<i>CBP3</i>	CA2518	involved in cytochrome-c reductase assembly	0.58	0.75
<i>CDR4</i>	CA3895	multidrug resistance protein	0.55	0.12
<i>CHL4</i>	CA4453	chromosome segregation protein	0.67	0.12
<i>CMK1</i>	CA6135	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent ser/thr protein kinase	0.61	0.20
<i>CNH1.3F</i>	CA0878	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter, 3-prime end	0.55	0.12
<i>CRD1</i>	CA2832	Cu-transporting P1-type ATPase	0.63	0.12
<i>CYP1</i>	CA0972	cyclophilin (peptidylprolyl isomerase), mitochondrial	0.64	0.60
<i>DAL53</i>	CA2957	allantoate permease	0.60	1.04
<i>DLD1</i>	CA4905	D-lactate ferricytochrome C oxidoreductase	0.66	1.04
<i>DLD2</i>	CA5942	D-lactate ferricytochrome C oxidoreductase	0.64	1.04
<i>EBP4</i>	CA4030	NADPH dehydrogenase	0.67	1.04
<i>ETF1</i>	CA0510	ETF-ubiquinonen oxidoreductase	0.61	0.12
<i>GIM5</i>	CA2888	Gim complex component	0.64	0.12
<i>GLN4</i>	CA5631	glutaminyl-tRNA synthetase	0.54	0.12
<i>HIS6</i>	CA1480	5 Pro-FAR isomerase	0.62	0.41
<i>HNT1</i>	CA2345	similarity to protein kinase C inhibitor-I	0.55	0.20
<i>IFB2</i>	CA2451	unknown function	0.59	0.12
<i>IFE2</i>	CA2075	unknown function	0.41	0.12
<i>IFF1.3EOC</i>	CA0344	unknown function, 3-prime end	0.21	0.75
<i>IFQ3</i>	CA2597	unknown function	0.60	0.12
<i>IPF10555.3EOC</i>	CA0688	unknown function, 3-prime end	0.55	0.12
<i>IPF10727</i>	CA4611	unknown function	0.55	0.12
<i>IPF10864</i>	CA1968	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rex4p	0.61	0.26
<i>IPF11081</i>	CA4032	unknown function	0.53	0.12
<i>IPF11667</i>	CA2187	unknown function	0.58	0.12
<i>IPF11688</i>	CA2867	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Apl4p	0.46	0.12
<i>IPF11714</i>	CA1331	unknown function	0.48	0.12
<i>IPF11759</i>	CA1943	unknown function	0.60	0.12
<i>IPF12138</i>	CA0820	unknown function	0.65	0.41
<i>IPF12303</i>	CA4392	glutathione-S-transferase	0.63	0.12
<i>IPF1261</i>	CA5668	unknown function	0.65	0.60
<i>IPF1264</i>	CA5669	unknown function	0.56	0.12
<i>IPF13081</i>	CA0588	unknown function	0.65	0.53
<i>IPF13678</i>	CA0370	unknown function	0.62	0.12
<i>IPF13683</i>	CA0260	unknown function	0.62	0.60
<i>IPF13944</i>	CA5011	unknown function	0.27	0.12

IPF14083	CA1008	similarity to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> carrier protein Flx1p	0.43	0.12
IPF14282	CA0446	Similar to mucin proteins	0.59	0.12
IPF14438	CA2282	unknown function	0.58	0.12
IPF14540	CA1615	putative multidrug protein	0.03	0.26
IPF14545	CA2314	unknown function	0.46	0.12
IPF14550	CA2822	unknown function	0.63	0.41
IPF14554	CA2823	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Osh3p	0.62	0.26
IPF14559.3F	CA1758	unknown function, 3-prime end	0.56	0.12
IPF14603	CA0785	unknown function	0.64	1.04
IPF14864	CA0572	unknown function	0.56	0.12
IPF15033	CA0295	unknown function	0.61	1.04
IPF15160	CA4454	unknown function	0.58	0.20
IPF15225	CA0402	Sorting nexin-like protein	0.54	0.20
IPF15297	CA5078	unknown function	0.60	0.12
IPF1548	CA5407	unknown function	0.59	0.12
IPF15601	CA0458	unknown function	0.65	0.20
IPF16662	CA1648	unknown function	0.67	0.12
IPF16901	CA2020	unknown function	0.48	0.12
IPF16924	CA2544	unknown function	0.65	0.12
IPF17026	CA2828	unknown function	0.66	0.12
IPF1798	CA5264	unknown function	0.50	0.12
IPF18207	CA4516	unknown function	0.57	0.12
IPF18474	CA2383	unknown function	0.32	0.75
IPF18561.3	CA2028	unknown function, , 3-prime end	0.36	0.53
IPF1882	CA6140	unknown function	0.61	0.53
IPF18822	CA0961	unknown function	0.55	0.53
IPF18924	CA0619	unknown function	0.63	0.12
IPF19974	CA3178	unknown function	0.63	0.20
IPF19980	CA3245	putative lipase	0.60	0.20
IPF19983	CA3336	unknown function	0.60	0.12
IPF20161	CA4125	unknown function	0.59	0.12
IPF20169	CA4381	unknown function	0.52	0.12
IPF2147	CA5320	unknown function	0.59	0.26
IPF2167	CA5310	unknown function	0.57	0.12
IPF2180	CA5303	unknown function	0.64	1.04
IPF2223	CA4587	unknown function	0.57	0.12
IPF2283	CA4266	unknown function	0.65	0.12
IPF2471	CA5728	maltose acetyltransferase	0.63	0.12
IPF2555	CA4075	unknown function	0.61	0.12
IPF2560	CA4072	unknown function	0.60	0.26
IPF257.3	CA5454	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fun34p	0.60	0.12
IPF2857	CA5526	unknown function	0.64	0.12
IPF3121	CA4651	unknown function	0.67	0.12
IPF3506	CA5953	unknown function	0.59	0.26
IPF351	CA5868	unknown function	0.50	0.12
IPF3597	CA5071	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ald4p	0.42	0.12
IPF3937	CA1203	Unknown function	0.66	0.12
IPF4039	CA4487	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nam8p	0.59	0.26
IPF4122	CA3641	unknown function	0.57	0.12
IPF420	CA5841	unknown function	0.66	0.26
IPF4288	CA4253	unknown function	0.61	0.20
IPF4305	CA4244	unknown function	0.59	0.26
IPF4328	CA0210	unknown function	0.45	0.12
IPF4450	CA0684	unknown function	0.62	0.12

<i>IPF448</i>	CA5643	unknown function	0.65	0.60
<i>IPF4696</i>	CA4970	unknown Function	0.45	0.12
<i>IPF4959</i>	CA6057	D-xylulose reductase	0.52	0.12
<i>IPF5078</i>	CA1469	unknown function	0.62	0.26
<i>IPF511</i>	CA5620	unknown function	0.55	0.12
<i>IPF5149</i>	CA4948	unknown function	0.37	0.41
<i>IPF5356</i>	CA3122	unknown function	0.48	0.12
<i>IPF5363</i>	CA3117	unknown function	0.60	0.26
<i>IPF549</i>	CA5604	unknown function	0.62	0.12
<i>IPF5604</i>	CA2815	unknown function	0.55	0.12
<i>IPF6032</i>	CA5168	unknown function	0.31	0.12
<i>IPF6156</i>	CA1625	similar to <i>C.elegans</i> LIM homeobox protein	0.66	0.12
<i>IPF6235</i>	CA2216	<i>Candida albicans</i> Tca2 retrotransposon	0.45	0.12
<i>IPF6238</i>	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	0.35	0.60
<i>IPF6342</i>	CA1458	unknown function	0.59	0.12
<i>IPF6629</i>	CA4127	unknown function	0.38	0.12
<i>IPF6803.5F</i>	CA2503	unknown function	0.66	0.12
<i>IPF6881</i>	CA2186	putative phosphatidyl synthase	0.50	0.12
<i>IPF6898</i>	CA3320	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>BUB1</i>	0.65	0.75
<i>IPF7081</i>	CA4121	unknown function	0.55	0.12
<i>IPF7289</i>	CA3878	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>UPC2</i>	0.47	0.12
<i>IPF7333</i>	CA0731	unknown function	0.59	0.26
<i>IPF7400</i>	CA0984	unknown function	0.67	0.12
<i>IPF7644</i>	CA1864	unknown function	0.65	0.12
<i>IPF7760</i>	CA3558	unknown function	0.46	1.04
<i>IPF7804.5F</i>	CA3567	unknown function	0.65	0.12
<i>IPF7970</i>	CA3259	unknown function	0.56	0.12
<i>IPF8889</i>	CA3758	putative arginase	0.56	0.12
<i>IPF9160</i>	CA4485	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>MED4</i>	0.60	0.12
<i>IPF946</i>	CA5968	unknown function	0.64	0.12
<i>IPF9550</i>	CA4570	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>OSMI</i>	0.33	0.12
<i>IPF9995</i>	CA1114	unknown function	0.64	0.12
<i>IPT1</i>	CA0228	mannosyl diphosphorylinositol ceramide	0.61	0.12
<i>MNT1</i>	CA3469	mannosyltransferase involved in N-linked and O-linked glycosylation	0.65	0.20
<i>MSS116</i>	CA1945	RNA helicase of the DEAD box family	0.58	0.12
<i>MYO1</i>	CA3233	myosin-1 isoform (type II myosin) heavy chain	0.60	0.12
<i>NCB2</i>	CA3794	transcriptional repressor by homology	0.55	0.12
<i>NMT1</i>	CA1063	N-myristoyltransferase	0.62	0.26
<i>PTC1</i>	CA2833	protein serine/threonine phosphatase 2c	0.56	0.12
<i>QDR1</i>	CA4501	putative antibiotic resistance proteins	0.65	0.12
<i>REV3.3F</i>	CA5689	DNA-directed DNA polymerase zeta subunit	0.62	0.26
<i>RNR22</i>	CA4492	ribonucleoside-diphosphate reductase	0.19	0.20
<i>RPS27A</i>	CA2130	ribosomal protein S27	0.65	0.53
<i>RSR1.3</i>	CA2385	GTP-binding protein	0.65	0.60
<i>SEC14</i>	CA5398	phosphatidylinositol-phosphatidylcholine transfer	0.62	0.12
<i>SNF7</i>	CA4903	class E Vps protein	0.65	0.60
<i>SNU114</i>	CA0350	snRNP-specific protein	0.67	0.12
<i>SPE4</i>	CA1249	spermine synthase	0.61	0.12
<i>SPS20</i>	CA1225	peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	0.66	0.53
<i>SSN6</i>	CA5907	transcriptional repressor	0.65	1.04
<i>TAL1</i>	CA2582	transaldolase	0.66	0.12
<i>UBP2</i>	CA0476	ubiquitin-specific proteinase	0.64	0.12
<i>UGA11.EXON2</i>	CA0772	4-aminobutyrate aminotransferase, exon 2	0.48	0.12
<i>URAI</i>	CA4745	dihydroorotate dehydrogenase	0.59	0.12

---

<i>URK1</i>	CA2961	uridine kinase	0.59	0.12
<i>YEA4</i>	CA2315	Golgi uridine diphosphate-N-acetylglucosamine transporter	0.57	0.12
<i>YSA1</i>	CA5909	sugar-nucleotide hydrolase	0.62	0.26

Tab. 16: Regulierte Gene in der *efg1* Mutante HLC52 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (243 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 4,6 %). Die Zellen wurden in hyphen-induzierenden Medium (30 min 10 % Serum bei 37°C) angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Metabolismus</b>				
<i>ICL1</i>	CA4446	isocitrate lyase	1.6	3.21
<i>IPF8806</i>	CA3309	6-phosphofructose-2-kinase	1.6	0.80
<b>Histone</b>				
<i>HHF21</i>	CA2862	histone H4	3.2	3.49
<i>HHT21</i>	CA2861	histone H3	3.2	3.21
<i>HTB1</i>	CA4697	histone H2B	2.2	3.21
<b>Zellwand und Transporter</b>				
<i>ECM2</i>	CA5930	involved in cell wall biogenesis and architecture	1.8	0.51
<i>GSL21</i>	CA2043	1,3-beta-D-glucan synthase subunit	1.5	1.03
<i>IPF8796</i>	CA4800	putative GPI-anchored protein related to Phr1, Phr2 and Phr3	1.8	0.51
<i>OPT2.3F</i>	CA2871	oligopeptide transporter, 3-prime end	2.6	4.63
<b>Ribosomale Proteine</b>				
<i>IPF8752</i>	CA4226	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mrpl24p	3.0	3.21
<i>RPL14B.3</i>	CA3602	ribosomal protein L14B, 3-prime end	3.4	0.80
<i>RPL19A.3</i>	CA6141	ribosomal protein L19.e, 3-prime end	1.8	3.71
<i>RPL38</i>	CA2734	ribosomal protein L38	1.7	3.21
<i>RPL42.3</i>	CA2023	ribosomal protein L36a, 3-prime end	1.7	0.51
<i>RPL6.3</i>	CA3123	ribosomal protein, 3-prime end	1.5	1.03
<i>RPL81</i>	CA6064	60S ribosomal protein L7a.e.B	1.6	3.49
<i>RPN4</i>	CA2854	26S proteasome subunit	1.7	0.80
<i>RPS12</i>	CA5920	acidic ribosomal protein S12	1.8	0.51
<i>RPS15.3</i>	CA6123	40S ribosomal protein S15, 3-prime end	1.7	0.80
<i>RPS19A.3</i>	CA6068	ribosomal protein S19.e, 3-prime end	1.5	1.03
<i>RPS26A</i>	CA4534	ribosomal protein S26.e.A, cytosolic	2.1	0.51
<i>RPS6A</i>	CA2708	ribosomal protein S6	1.6	0.51
<i>YST1.EXON2</i>	CA5021	ribosomal protein, exon 2	2.1	0.51
<b>Stressproteine</b>				
<i>IPF1218</i>	CA4835	similar to superoxide dismutase	2.4	0.80
<i>MXR1</i>	CA0123	methionine sulfoxide reductase	1.7	3.21
<i>SSA1</i>	CA2857	heat shock protein of Hsp70 family	2.6	0.51
<i>SSE1</i>	CA1911	heat shock protein of Hsp70 family	1.6	0.51
<b>Unbekannte und Unklassifizierte</b>				
<i>ADE12</i>	CA4752	adenylosuccinate synthetase	3.3	2.77
<i>ADE2</i>	CA6139	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	1.7	3.49
<i>AIP2</i>	CA2406	Actin interacting protein 2	1.8	0.51
<i>BET5</i>	CA2508	targeting and fusion of ER to Golgi transport vesicles	2.0	0.51
<i>BNI1</i>	CA3597	regulator of budding	1.9	0.80
<i>CCN1</i>	CA2479	G1 cyclin	1.5	3.21
<i>CDC55</i>	CA4535	B subunit of protein phosphatase 2A	1.5	0.51
<i>CHA12</i>	CA3945	L-serine/L-threonine deaminase	2.6	0.51

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

<i>CMK1</i>	CA6135	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent ser/thr protein kinase	1.5	0.51
<i>COX13</i>	CA4536	cytochrome-c oxidase chain VIa	1.9	2.77
<i>ERG12</i>	CA3072	mevalonate kinase	1.5	1.95
<i>FTR1</i>	CA5345	High affinity iron permease	2.0	0.80
<i>GCV2</i>	CA3883	glycine decarboxylase P subunit	2.0	0.51
<i>HIK1.5EOC</i>	CA0108	histidine kinase, 5-prime end	1.8	0.51
<i>HOM2</i>	CA3984	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	2.8	0.51
<i>HPR5</i>	CA6088	ATP-dependent DNA helicase	1.7	3.99
<i>HRP1</i>	CA6073	nuclear polyadenylated RNA-binding protein	1.6	0.51
<i>IFA12</i>	CA2755	unknown function	1.9	0.51
<i>IFC3</i>	CA2349	unknown function	1.6	3.21
<i>IFC4</i>	CA0442	unknown function	1.5	3.71
<i>IFU1.5F</i>	CA2267	unknown function	3.8	1.03
<i>ILV5</i>	CA1983	ketol-acid reducto-isomerase	2.5	2.77
<i>IMH3.EXON1</i>	CA1246	IMP dehydrogenase, exon 1	2.6	1.03
<i>IPF10003</i>	CA3219	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rnh70p	1.8	3.21
<i>IPF10021</i>	CA3017	unknown function	1.5	1.49
<i>IPF10029</i>	CA3015	unknown function	2.3	3.21
<i>IPF10045</i>	CA1622	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Taf61p	2.6	4.63
<i>IPF10391</i>	CA4502	Similar to dnaJ proteins	2.4	3.21
<i>IPF10919</i>	CA2625	Similar to Flo1p	2.2	3.99
<i>IPF10929</i>	CA2232	unknown function	1.6	3.21
<i>IPF11045</i>	CA1517	unknown function	1.8	3.99
<i>IPF11262</i>	CA3083	unknown function	1.6	3.21
<i>IPF11460</i>	CA1060	unknown function	1.6	3.49
<i>IPF11802</i>	CA2005	unknown function	2.2	3.49
<i>IPF11814</i>	CA1233	unknown function	2.7	3.21
<i>IPF11817</i>	CA1231	unknown function	3.0	3.49
<i>IPF11936.3F</i>	CA3701	unknown function	1.5	3.62
<i>IPF12662</i>	CA0973	unknown function	2.6	0.51
<i>IPF12782</i>	CA2530	unknown function	1.5	3.21
<i>IPF13582</i>	CA3338	unknown function	2.2	0.51
<i>IPF13756.3F</i>	CA2414	unknown function	1.5	2.77
<i>IPF14094</i>	CA5482	repeated protein (10 times) of unknown function	1.7	0.80
<i>IPF14448</i>	CA2970	unknown function	1.9	4.63
<i>IPF14562</i>	CA1756	unknown function	2.3	3.62
<i>IPF14676</i>	CA2976	unknown function	4.3	3.49
<i>IPF14706</i>	CA1777	unknown function	1.8	1.03
<i>IPF15870</i>	CA2769	unknown function	2.1	0.51
<i>IPF1660</i>	CA4879	unknown function	1.8	4.63
<i>IPF17186</i>	CA0828	unknown function	3.5	0.51
<i>IPF17881</i>	CA0918	cyclin	2.0	0.51
<i>IPF18316.3F</i>	CA3628	unknown function	4.3	0.51
<i>IPF19168</i>	CA0162	unknown function	1.9	3.21
<i>IPF19195.3F</i>	CA0144	putative amino acid or GABA permease, 3-prime end	4.2	3.49
<i>IPF19724</i>	CA1182	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tbf1p	1.6	3.21
<i>IPF20030</i>	CA5740	unknown function	2.5	1.03
<i>IPF20152</i>	CA3975	unknown function	2.5	3.49
<i>IPF2280</i>	CA4264	unknown function	1.6	3.99
<i>IPF276</i>	CA5459	unknown function	2.7	3.21
<i>IPF2822</i>	CA5924	unknown function	1.6	3.21
<i>IPF2954</i>	CA3057	unknown function	1.5	0.51
<i>IPF3491</i>	CA5944	unknown function	1.6	0.51
<i>IPF3616</i>	CA4338	unknown function	1.6	0.51

<i>IPF3631</i>	CA4344	unknown function	1.7	3.49
<i>IPF3647</i>	CA4354	unknown function	1.6	0.80
<i>IPF4398</i>	CA4527	unknown function	1.5	1.03
<i>IPF4764</i>	CA3938	unknown function	1.5	0.80
<i>IPF4835</i>	CA6071	Zinc finger protein	1.5	4.63
<i>IPF5198</i>	CA1128	unknown function	2.2	1.03
<i>IPF5681</i>	CA1100	unknown function	4.8	0.51
<i>IPF6076.3</i>	CA3594	unknown function	2.2	3.21
<i>IPF6101.3</i>	CA3076	unknown function	2.1	1.95
<i>IPF6105</i>	CA3075	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gualp	1.6	1.95
<i>IPF661</i>	CA6002	unknown function	1.6	3.21
<i>IPF6712.5F</i>	CA3955	unknown function	1.5	3.21
<i>IPF7030</i>	CA1210	unknown function	1.8	3.21
<i>IPF7133.3</i>	CA3983	unknown function	1.6	3.62
<i>IPF7575</i>	CA1097	putative endo-exonuclease	1.6	3.21
<i>IPF7891</i>	CA3712	unknown function	2.2	2.77
<i>IPF7927</i>	CA0431	putative aldose reductase	1.8	0.51
<i>IPF7940</i>	CA3848	unknown function	2.2	3.49
<i>IPF8746</i>	CA1548	putative alpha-1,3-mannosyltransferase	1.7	0.51
<i>IPF8811</i>	CA3313	unknown function	1.5	3.21
<i>IPF89.3</i>	CA6109	unknown function	1.6	0.51
<i>IPF9401</i>	CA5395	unknown function	1.5	0.51
<i>IPF9562</i>	CA3357	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nuf2p	2.5	1.03
<i>IPF963</i>	CA5964	unknown function	1.5	3.62
<i>IPF9785</i>	CA0717	unknown function	1.6	1.03
<i>KIP3</i>	CA5651	kinesin-related protein required for nuclear migration	1.6	3.49
<i>MRT4</i>	CA2283	required for mRNA decay	1.6	3.21
<i>MSH3</i>	CA1127	DNA mismatch repair	2.6	3.21
<i>MTR10</i>	CA1811	Involved in nuclear protein import	2.4	3.71
<i>NAB3</i>	CA0084	polyadenylated RNA-binding protein	2.0	2.77
<i>NAG2</i>	CA1131	N-acetyl-glucosamine-6-phosphate deacetylase	1.6	3.49
<i>PHO87</i>	CA0548	member of the phosphate permease family	1.5	4.63
<i>PHR1</i>	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase.7	1.6	0.51
<i>POB3</i>	CA3985	binds DNA polymerase delta	2.2	3.21
<i>POT1</i>	CA1505	acetyl-CoA C-acyltransferase, peroxisomal	2.4	0.51
<i>POT11</i>	CA5862	peroxysomal 3-ketoacyl-CoA thiolase A	1.8	3.99
<i>PRO2</i>	CA5926	proline biosynthetic enzyme	1.6	3.21
<i>PUT4</i>	CA4186	proline permease	1.6	3.49
<i>RIB7</i>	CA3495	http reductase	2.3	1.49
<i>RNH1</i>	CA0277	ribonuclease H	2.6	0.51
<i>RNH1.EXON2</i>	CA1651	ribonuclease H, exon 2	1.7	1.95
<i>RNR21</i>	CA4155	ribonucleoside-diphosphate reductase	2.7	0.51
<i>SBA1</i>	CA0896	Hsp90-associated Co-chaperone	1.9	0.51
<i>SHM2</i>	CA0895	serine hydroxymethyltransferase precursor	2.8	0.51
<i>TBP1</i>	CA2369	TATA-binding protein	1.7	0.51
<i>TUB2.3</i>	CA4897	Beta-tubulin, 3-prime end	1.5	1.95
<i>UFE1</i>	CA5284	endoplasmic reticulum t-SNARE	1.7	3.71
<i>VID21</i>	CA0604	unknown function	2.0	1.03
<i>YPT521</i>	CA5342	GTP-binding protein of the Rab/Ypt family	1.8	3.49

**Herunterregulierte Gene****Glykolyse**

<i>ENO1</i>	CA3874	enolase I (2-phosphoglycerate dehydratase)	0.59	0.80
<i>FBA1</i>	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase	0.58	1.49
<i>GLK1</i>	CA0263	aldohexose specific glucokinase	0.43	0.51
<i>GPM1</i>	CA4671	phosphoglycerate mutase	0.52	0.51
<i>HXK2.3F</i>	CA0127	hexokinase II, 3-prime end	0.58	0.80
<i>PFK1</i>	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	0.54	0.51
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0.65	1.49
<i>PGI1</i>	CA3559	glucose-6-phosphate isomerase	0.42	0.51

**Reservekohlenhydratstoffwechsel**

<i>IPF8321</i>	CA2938	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Glg2p	0.49	0.51
<i>TPS2</i>	CA5066	threulose-6-phosphate phosphatase	0.48	0.51
<i>GSY1</i>	CA5467	glycogen synthase	0.64	3.21

**Metabolismus**

<i>ADH1</i>	CA4765	alcohol dehydrogenase	0.67	3.21
<i>ADH5</i>	CA2391	probable alcohol dehydrogenase	0.45	0.51
<i>GAD1</i>	CA1564	glutamate decarboxylase	0.65	0.51
<i>GDH2</i>	CA1775	NAD-specific glutamate dehydrogenase (NAD)	0.53	0.51
<i>MDH1</i>	CA5164	mitochondrial malate dehydrogenase precursor	0.62	0.51
<i>PGK1</i>	CA1691	phosphoglycerate kinase	0.55	0.51

**Zellwand und Transporter**

<i>ALS1.3EOC</i>	CA0316	agglutinin-like protein	0.31	0.51
<i>ALS10</i>	CA0448	agglutinin like protein	0.46	0.51
<i>ALS12.3F</i>	CA0413	agglutinin-like protein	0.42	0.51
<i>ALS4.3F</i>	CA1528	agglutinin-like protein	0.43	0.51
<i>BPT1.5F</i>	CA3545	membrane transporter of the ATP-binding cassette	0.63	1.49
<i>FET34.3EOC</i>	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end	0.60	0.51
<i>HWPI</i>	CA2825	hyphal wall protein	0.64	4.63
<i>IPF20169</i>	CA4381	RBT5-like: Mycelial surfaceantigen precursor	0.45	0.51
<i>IPF19766</i>	CA2746	unknown function	0.57	0.51
<i>RBT5</i>	CA2558	repressed by Tup1 protein 5	0.43	0.51

**Transkriptionsfaktoren**

<i>EFG1</i>	CA2787	enhanced filamentous growth factor	0.53	0.51
<i>IPF3912</i>	CA4960	CUP9-homeodomain protein	0.59	0.51
<i>TYE7</i>	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor	0.67	2.77

**Stressproteine**

<i>HSP12</i>	CA0627	heat shock protein	0.38	0.51
<i>DDR48</i>	CA4336	stress protein	0.63	0.51
<i>GPX2</i>	CA0558	glutathione peroxidase	0.47	0.51

**Unbekannte und Unklassifizierte**

<i>ACT1</i>	CA5255	Actin	0.58	3.49
<i>AQY1</i>	CA2873	similarity to plasma membrane and water channel proteins	0.59	0.51
<i>COF1</i>	CA5409	cofilin	0.61	3.21
<i>DLH1.3F</i>	CA1007	meiotic recombination protein, 3-prime end	0.57	2.77
<i>HAM1</i>	CA1460	Controls 6-N-hydroxylaminopurine sensitivity and mutagenesis	0.59	3.71
<i>HRD3</i>	CA2651	involved in HMG-CoA reductase degradation	0.65	3.21
<i>IFE2</i>	CA2075	unknown function	0.65	4.63
<i>IPF10138.5F</i>	CA1356	unknown function	0.64	0.51
<i>IPF10179</i>	CA1634	unknown function	0.65	0.51

---

<i>IPF10662</i>	CA3827	IHD1	0.30	0.51
<i>IPF11363</i>	CA2802	unknown function	0.65	0.80
<i>IPF11667</i>	CA2187	unknown function	0.66	0.51
<i>IPF11702</i>	CA2806	unknown function	0.67	2.77
<i>IPF11713</i>	CA1330	unknown function	0.67	3.21
<i>IPF11858</i>	CA1411	unknown function	0.53	0.51
<i>IPF12303</i>	CA4392	glutathione-S-transferase	0.67	3.21
<i>IPF12611</i>	CA1854	unknown function	0.65	1.49
<i>IPF13522</i>	CA0566	unknown function	0.60	1.49
<i>IPF13782</i>	CA3301	unknown function	0.67	3.99
<i>IPF14282</i>	CA0446	Similar to mucin proteins	0.57	0.51
<i>IPF14598</i>	CA1360	unknown function	0.64	0.51
<i>IPF15297</i>	CA5078	unknown function	0.64	0.51
<i>IPF1634</i>	CA4886	unknown function	0.65	3.99
<i>IPF1649</i>	CA4883	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Bem2p	0.56	0.51
<i>IPF16646</i>	CA1167	unknown function	0.58	0.51
<i>IPF16662</i>	CA1648	unknown function	0.61	3.21
<i>IPF16947</i>	CA5473	unknown function	0.66	1.49
<i>IPF16981</i>	CA1870	unknown function	0.67	3.71
<i>IPF17840</i>	CA0059	unknown function	0.67	0.51
<i>IPF1798</i>	CA5264	unknown function	0.32	0.51
<i>IPF18587</i>	CA1925	putative methyltransferase	0.53	0.51
<i>IPF18853</i>	CA0843	unknown function	0.65	3.49
<i>IPF19801</i>	CA4566	unknown function	0.66	0.51
<i>IPF19897</i>	CA1050	unknown function	0.64	4.63
<i>IPF19953</i>	CA2562	unknown function	0.51	0.51
<i>IPF19977</i>	CA3211	unknown function	0.65	1.49
<i>IPF20056</i>	CA0495	unknown function	0.54	0.51
<i>IPF3336</i>	CA4771	unknown function	0.62	3.21
<i>IPF3897.5F</i>	CA1954	unknown function	0.66	3.71
<i>IPF3937</i>	CA1203	unknown function	0.62	0.51
<i>IPF3964</i>	CA4111	unknown function	0.55	0.51
<i>IPF4065</i>	CA0386	unknown function	0.63	0.51
<i>IPF4293</i>	CA4249	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gpi2p	0.66	4.63
<i>IPF4696</i>	CA4970	unknown function	0.52	0.51
<i>IPF4959</i>	CA6057	D-xylulose reductase	0.48	0.51
<i>IPF5217</i>	CA5382	unknown function	0.67	3.49
<i>IPF5806</i>	CA4216	unknown function	0.33	0.51
<i>IPF6342</i>	CA1458	unknown function	0.35	0.51
<i>IPF6518</i>	CA2302	unknown function	0.66	4.63
<i>IPF652</i>	CA6006	unknown function	0.01	1.49
<i>IPF6881</i>	CA2186	putative phosphatidyl synthase	0.63	1.49
<i>IPF7109</i>	CA5650	unknown function	0.62	0.51
<i>IPF7666</i>	CA1120	unknown function	0.59	0.80
<i>IPF7715</i>	CA0706	unknown function	0.65	0.80
<i>IPF9057</i>	CA2649	unknown function	0.62	0.80

---

<i>IPF9145</i>	CA0962	unknown function	0.59	0.51
<i>IPF9167</i>	CA2697	unknown function	0.64	0.51
<i>IPF946</i>	CA5968	unknown function	0.60	0.51
<i>IPF9995</i>	CA1114	unknown function	0.55	0.51
<i>LPI9</i>	CA3110	microtubule-associated protein	0.67	0.80
<i>MAL31</i>	CA3404	maltose permease	0.52	0.51
<i>MNN22</i>	CA0752	golgi alpha-1,2-mannosyltransferase	0.64	0.51
<i>NEM1</i>	CA2705	required for nuclear morphology	0.58	0.51
<i>PET191.3</i>	CA5759	assembly of cytochrome oxidase, 3-prime end	0.62	0.80
<i>PHO8.5</i>	CA0892	repressible alkaline phosphatase, 5-prime end	0.62	0.80
<i>PUT1</i>	CA1552	proline oxidase	0.65	0.51
<i>RPC31</i>	CA2546	DNA-directed RNA polymerase III	0.64	0.80
<i>RSP5</i>	CA1279	ubiquitin-protein ligase	0.66	3.21
<i>SOK1</i>	CA1536	high copy suppressor of a cyclic AMP-dependent protein kinase mutant	0.67	1.95
<i>TAF90</i>	CA4247	probable transcription-associated factor protein	0.63	4.63
<i>TFS1</i>	CA0748	cdc25-dependent nutrient- and ammonia-response cell-cycle regulator	0.61	3.62
<i>UNG1</i>	CA5720	uracil-DNA glycosylase	0.59	3.49

Tab. 17: Regulierte Gene in der *efh1*-Mutante C4/d6-3 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (9 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 4,8 %). Die Zellen wurden in YPD-Medium bei 30°C angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<i>IPF4696</i>	CA4970	unknown function	1.7	1.59
<b>Herunterregulierte Gene</b>				
<i>IPF10277</i>	CA0946	unknown function	0.5	1.44
<i>IPF17064</i>	CA3496	unknown function	0.63	4.69
<i>IPF17186</i>	CA0828	unknown function	0.61	1.44
<i>IPF4328</i>	CA0210	unknown function	0.67	1.44
<i>IPF6493</i>	CA0193	unknown function	0.64	4.83
<i>IPF7109</i>	CA5650	unknown function	0.58	1.44
<i>IPF9901</i>	CA2426	similar to <i>S. cerevisiae</i> Rad18p DNA repair protein	0.52	4.69
<i>KRE9</i>	CA2958	cell wall synthesis protein	0.65	4.42

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

Tab. 18: Regulierte Gene in der *efh1*-Mutante C4/d6-3 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (39 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 5,0 %). Die Zellen wurden in hyphen-induzierenden Medium (30 min 10 % Serum bei 37°C) angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Ribosomale Proteine</b>				
<i>RPL42.3</i>	CA2023	ribosomal protein L36a, 3-prime end	1.67	2.37
<i>RPS12</i>	CA5920	acidic ribosomal protein S12	1.56	0.90
<i>RPS30.3</i>	CA2587	40S ribosomal protein S30, 3-prime end	1.67	0.90
<i>RPS6A</i>	CA2708	ribosomal protein S6	1.59	0.90
<b>Unbekannte und Unklassifizierte</b>				
<i>CSE1.3F</i>	CA2982	importin-beta-like protein, 3-prime	1.59	1.10
<i>ECE1</i>	CA1402	cell elongation protein	1.60	0.90
<i>FRP2</i>	CA3153	member of the FRP family of proteins related to Y. lipolytica glyoxylate pathway regulator Gpr1p and S. cerevisiae Fun34p	1.67	0.90
<i>FTR1</i>	CA5345	High affinity iron permease	1.68	3.85
<i>GAL1</i>	CA4040	galactokinase	1.75	0.90
<i>GFA1</i>	CA4016	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	1.60	0.90
<i>IDP2</i>	CA0643	isocitrate dehydrogenase, cytosolic	1.55	0.90
<i>IPF15870</i>	CA2769	unknown function	1.64	0.90
<i>IPF17237</i>	CA1716	unknown function	1.80	0.90
<i>IPF20016</i>	CA4514	similar to S. cerevisiae Sec63p ER protein-translocation complex subunit	1.51	5.04
<i>IPF3416</i>	CA2015	unknown function	3.51	3.85
<i>IPF3647</i>	CA4354	unknown function	1.58	0.90
<i>IPF3870</i>	CA1247	similar to Saccharomyces cerevisiae Rts1p potential regulatory subunit of protein phosphatase 2A	1.60	0.90
<i>IPF4481</i>	CA4749	unknown function	1.51	3.85
<i>IPF6117</i>	CA3069	unknown function	1.60	0.90
<i>IPF8806</i>	CA3309	6-phosphofructose-2-kinase	1.52	0.90
<i>KRR1</i>	CA4096	involved in cell division and spore germination	1.50	0.90
<i>MSB3</i>	CA2717	GTPase-activating protein for Sec4p	1.61	1.10
<i>PET9</i>	CA5388	ADP/ATP carrier protein	1.78	3.85
<i>PMT1</i>	CA4424	mannosyltransferase	1.70	0.90
<i>POT11</i>	CA5862	peroxysomal 3-ketoacyl-CoA thiolase A	1.54	0.90
<i>POX4</i>	CA1572	peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase	1.56	0.90
<i>SEC26</i>	CA4242	Beta chain of secretory vesicles coatomer complex	1.51	0.90
<i>SHM2</i>	CA0895	Serine hydroxymethyltransferase precursor, mitochondrial	2.03	0.90
<i>SPC2</i>	CA3731	signal peptidase 18 kDa subunit	1.60	0.90
<i>STL2.3F</i>	CA5606	sugar transporter, 3-prime end	1.54	5.04
<i>TUB2.3</i>	CA4897	Beta-tubulin, 3-prime end	1.60	0.90

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

**Herunterregulierte Gene****Unbekannte und Unklassifizierte**

<i>COS161</i>	CA0490	involved in manganese homeostasis	0.56	0.90
<i>HSH49</i>	CA3579	spliceosome-associated essential protein	0.66	0.90
<i>IPF15013</i>	CA2761	pyruvate decarboxylase regulatory protein	0.66	3.85
<i>IPF3920</i>	CA4964	unknown function	0.66	3.85
<i>IPF4303</i>	CA4245	unknown function	0.65	5.04
<i>IPF4959</i>	CA6057	D-xylulose reductase	0.64	3.85
<i>STF2</i>	CA2738	ATP synthase regulatory factor	0.62	0.90
<i>TRX2</i>	CA0467	thioredoxin	0.67	3.85

Tab. 19: Regulierte Gene in der *efg1/efh1*-Mutante H/1.22 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (112 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 5,1 %). Die Zellen wurden in YPD-Medium bei 30°C angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Metabolismus</b>				
<i>ACH1</i>	CA0345	acetyl-coenzyme-A hydrolase	1.8	0.83
<i>ACS2</i>	CA2858	acetyl-coenzyme-A synthetase	1.5	0.83
<i>IPF15013</i>	CA2761	pyruvate decarboxylase regulatory protein	1.6	0.83
<b>Histone</b>				
<i>HHF21</i>	CA2862	histone H4	2.0	0.83
<i>HHF22</i>	CA3372	histone H4	2.2	0.83
<i>HHT21</i>	CA2861	histone H3	2.0	0.83
<i>RPD31</i>	CA2549	histone deacetylase B	3.5	0.83
<b>Transkriptionsfaktoren</b>				
<i>CTA25</i>	CA0050	transcriptional activation	1.6	0.83
<i>SEF1</i>	CA2346	putative transcription factor1	1.6	1.40
<i>TYE7</i>	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor	2.5	0.83
<b>Stressproteine</b>				
<i>SSA1</i>	CA2857	heat shock protein of HSP70 family	1.6	4.89
<i>YHB1</i>	CA0943	flavo-hemoglobin	3.3	0.83
<b>Formatdehydrogenasen</b>				
<i>FDH11.3</i>	CA6000	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, 3-prime end	1.6	0.83
<i>FDH12</i>	CA1846	formate dehydrogenase	4.0	0.83
<i>FDH3.3F</i>	CA1253	formate dehydrogenase, 3-prime end	1.7	0.83
<i>FDH4.3F</i>	CA0636	Formate dehydrogenase, 3-prime end	3.2	0.83
<b>Eisenstoffwechsel</b>				
<i>FET33</i>	CA2924	cell surface ferroxidase	1.5	0.83
<i>FRE7</i>	CA5621	ferric reductase transmembrane component	2.0	0.83
<i>CFL1</i>	CA3460	ferric reductase	1.9	0.83
<b>Unbekannte und Unklassifizierte</b>				
<i>CDR1</i>	CA6066	multidrug resistance protein	2.5	0.83
<i>DBP2.EXON2</i>	CA1415	ATP-dependent RNA helicase of DEAD box family, exon 2	1.6	3.22
<i>DDC1</i>	CA0391	DNA damage checkpoint protein	2.2	1.40
<i>EBP7</i>	CA2227	NADPH dehydrogenase	2.6	0.83
<i>GRP3</i>	CA2963	dihydroflavonol-4-reductases	2.1	0.83
<i>IFC4</i>	CA0442	unknown function	1.5	4.89
<i>IPF10138.5F</i>	CA1356	unknown function	2.0	2.09
<i>IPF10355</i>	CA4841	unknown function	2.2	0.83
<i>IPF10391</i>	CA4502	similar to dnaJ proteins	1.7	0.83
<i>IPF10429</i>	CA0721	unknown function	1.5	0.83
<i>IPF11262</i>	CA3083	unknown function	1.6	0.83
<i>IPF11725</i>	CA2903	unknown function	1.7	0.83
<i>IPF11998</i>	CA1898	unknown function	1.5	1.40

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

<i>IPF1239</i>	CA0077	unknown function	1.5	0.83
<i>IPF1286</i>	CA5677	unknown function	3.3	2.09
<i>IPF13582</i>	CA3338	unknown function	1.6	2.98
<i>IPF14285</i>	CA1962	unknown function	1.5	2.98
<i>IPF16047</i>	CA0381	unknown function	2.3	3.22
<i>IPF18474</i>	CA2383	unknown function	1.6	2.98
<i>IPF1848</i>	CA6154	similar to <i>S. cerevisiae</i> Snu13p	1.5	4.89
<i>IPF2178</i>	CA5304	unknown function	2.0	0.83
<i>IPF2392</i>	CA5893	unknown function	1.9	1.40
<i>IPF3309.3EOC</i>	CA5696	unknown function	1.7	2.09
<i>IPF3406</i>	CA2093	unknown function	1.7	0.83
<i>IPF4835</i>	CA6071	Zinc finger protein	1.6	0.83
<i>IPF5376</i>	CA2288	unknown function	1.7	0.83
<i>IPF538</i>	CA5609	unknown function	1.6	0.83
<i>IPF564</i>	CA5596	unknown function	1.5	1.40
<i>IPF6266</i>	CA3277	unknown function	2.0	2.98
<i>IPF6561</i>	CA4661	unknown function	1.6	0.83
<i>IPF6654</i>	CA4305	unknown function	1.9	0.83
<i>IPF676</i>	CA5995	unknown function	1.5	4.89
<i>IPF8210</i>	CA5480	unknown function	4.4	1.40
<i>IPF8336</i>	CA2839	unknown function	2.1	0.83
<i>IPF8404</i>	CA2797	putative helicase	2.5	0.83
<i>IPF8423</i>	CA1384	similar to <i>S. cerevisiae</i> Dhs1p exonuclease	1.6	4.89
<i>IPF8527</i>	CA5476	unknown function	2.8	0.83
<i>IPF8537</i>	CA2157	similar to <i>S. cerevisiae</i> Cne1p calnexin	2.1	1.40
<i>IPF856</i>	CA5352	unknown function	2.2	2.09
<i>KEM1.3</i>	CA0767	multifunctional nuclease, 3-prime end	2.5	0.83
<i>MOT1</i>	CA2331	transcriptional accessory protein	1.5	0.83
<i>MVP1.EXON2</i>	CA5220	required for vacuolar protein sorting	1.9	0.83
<i>NDH2</i>	CA2659	NADH dehydrogenase	4.3	0.83
<i>OST2</i>	CA2260	oligosaccharyltransferase epsilon subunit	1.7	2.98
<i>PLB3</i>	CA3834	phospholipase B	2.8	4.89
<i>RPB11.3</i>	CA2987	DNA-directed RNA polymerase II subunit	2.1	2.09
<i>RPB140</i>	CA0987	DNA-dependent RNA polymerase II RPB140	6.0	1.40
<i>RPS31</i>	CA2011	ubiquitin fusion protein	1.6	2.09
<i>RPS620A</i>	CA3267	unknown function	2.8	0.83
<i>RPS620B</i>	CA3268	unknown function	2.3	0.83
<i>SBH1</i>	CA1072	involved in translocation into the ER	1.6	0.83
<i>SKP1</i>	CA1285	kinetochore protein complex CBF3	1.5	0.83
<i>SKS1</i>	CA4039	serine/threonine kinase	2.4	0.83
<i>STT3</i>	CA4528	oligosaccharyl transferase	2.5	3.22
<i>UBP12</i>	CA1124	ubiquitin C-terminal hydrolase	1.9	0.83

## Herunterregulierte Gene

### Glykolyse

<i>ENO1</i>	CA3874	enolase I (2-phosphoglycerate dehydratase)	0.60	0.83
<i>FBA1</i>	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase	0.46	0.83
<i>GLK1</i>	CA0263	aldohexose specific glucokinase	0.54	0.83
<i>GPM1</i>	CA4671	phosphoglycerate mutase	0.56	0.83
<i>PFK1</i>	CA1834	6-phosphofruktokinase, alpha subunit	0.53	0.83
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofruktokinase, beta subunit	0.65	2.98
<i>PGII</i>	CA3559	glucose-6-phosphate isomerase	0.64	0.83
<i>TPI1</i>	CA5950	Triose phosphate isomerase	0.58	0.83

<i>HXK2.3F</i>	CA0127	hexokinase II, 3-prime end	0.49	0.83
<b>Reservekohlenhydratstoffwechsel</b>				
<i>GPH1</i>	CA5206	glycogen phosphorylase	0.57	0.83
<i>GSY1</i>	CA5467	glycogen synthase	0.51	0.83
<i>IPF8321</i>	CA2938	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Glg2p	0.53	0.83
<i>TPS3.3</i>	CA5505	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	0.49	0.83
<b>Unbekannte und Unklassifizierte</b>				
<i>AGP1</i>	CA1373	asparagine and glutamine permease	0.57	0.83
<i>CBP3</i>	CA2518	involved in cytochrome-c reductase assembly	0.44	0.83
<i>DAK2.3EOC</i>	CA0311	dihydroxyacetone kinase, 3-prime end	0.50	0.83
<i>EFG1</i>	CA2787	enhanced filamentous growth factor	0.64	0.83
<i>HSP12</i>	CA0627	Heat shock protein	0.48	0.83
<i>IFE2</i>	CA2075	unknown function	0.48	0.83
<i>IPF11759</i>	CA1943	unknown function	0.66	0.83
<i>IPF2857</i>	CA5526	unknown function	0.66	1.40
<i>IPF351</i>	CA5868	unknown function	0.52	0.83
<i>IPF3937</i>	CA1203	unknown function	0.61	0.83
<i>IPF4328</i>	CA0210	unknown function	0.56	0.83
<i>IPF4959</i>	CA6057	D-xylulose reductase	0.67	2.98
<i>IPF5185 (FLO1)</i>	CA1678	putative cell wall protein	0.25	0.83
<i>IPF6235</i>	CA2216	<i>Candida albicans</i> Tca2 retrotransposon	0.62	0.83
<i>IPF6238</i>	CA2752	GAG protein of retrotransposon pCal	0.71	1.40
<i>IPF6518</i>	CA2302	unknown function	0.41	0.83
<i>IPF6629</i>	CA4127	unknown function	0.50	0.83
<i>IPF6881</i>	CA2186	putative phosphatidyl synthase	0.67	3.22
<i>IPF7289</i>	CA3878	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Upc2p	0.54	0.83
<i>IPF9550</i>	CA4570	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Osm1p	0.52	0.83
<i>PRA1</i>	CA4399	pH-regulated antigen	0.64	1.40
<i>RHR2</i>	CA5788	DL-glycerol phosphatase	0.60	0.83
<i>SUR2</i>	CA2225	hydroxylation of C-4 of the sphingoid moiety of ceramide	0.37	0.83
<i>TFC1</i>	CA5163	transcription initiation factor TFIIC 95 kD subunit	0.54	0.83
<i>URAI</i>	CA4745	dihydroorotate dehydrogenase	0.61	0.83

Tab. 20: Regulierte Gene in der *efg1/efh1*-Mutante H/1.22 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm CAF2-1 (109 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 5,1 %). Die Zellen wurden in hyphen-induzierenden Medium (30 min 10 % Serum bei 37°C) angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Metabolismus</b>				
<i>ARD8</i>	CA3288	D-arabinitol dehydrogenase	1.51	1.43
<i>CHA12</i>	CA3945	L-serine/L-threonine deaminase	1.76	1.05
<i>MLS1</i>	CA4748	malate synthase	1.51	1.05
<b>Stressproteine</b>				
<i>HSP60</i>	CA1239	heat shock protein 60	1.51	1.43
<i>SSA1</i>	CA2857	heat shock protein of HSP70 family	1.68	1.43
<b>Formatdehydrogenasen</b>				
<i>FDH12</i>	CA1846	formate dehydrogenase	1.90	1.43
<i>FDH13.3F</i>	CA0639	putative formate dehydrogenase, 3-prime end	1.68	1.05
<i>FDH4.3F</i>	CA0636	formate dehydrogenase, 3-prime end	1.76	1.43
<b>Eisenmetabolismus</b>				
<i>FTR1</i>	CA5345	high affinity iron permease	2.41	1.43
<i>FTR2</i>	CA5354	high affinity iron permease	1.89	2.96
<b>Unbekannte und Unklassifizierte</b>				
<i>ARG81.3EOC</i>	CA2624	transcription factor possibly involved in arginine metabolism, 3-prime end	2.04	1.43
<i>GCV2</i>	CA3883	glycine decarboxylase P subunit	1.51	2.84
<i>HIK1.5EOC</i>	CA0108	histidine kinase, 5-prime end	1.51	2.84
<i>IPF10911</i>	CA2629	unknown function	1.64	4.21
<i>IPF10929</i>	CA2232	unknown function	1.56	2.84
<i>IPF11262</i>	CA3083	unknown function	1.51	1.05
<i>IPF12824</i>	CA2594	unknown function	1.51	2.84
<i>IPF14614</i>	CA0288	unknown function	1.53	4.21
<i>IPF14624</i>	CA1343	unknown function	3.94	5.07
<i>IPF15706</i>	CA2831	unknown function	1.63	2.84
<i>IPF18393</i>	CA3028	unknown function	1.65	2.84
<i>IPF18512</i>	CA2209	unknown function	2.02	4.21
<i>IPF18579.5F</i>	CA1970	unknown function	4.50	2.84
<i>IPF19195.3F</i>	CA0144	putative amino acid or GABA permease, 3-prime end	3.18	2.96
<i>IPF19980</i>	CA0093	putative lipase	1.58	2.84
<i>IPF20163</i>	CA4135	unknown function	1.57	2.84
<i>IPF3394</i>	CA2088	unknown function	4.26	4.02
<i>IPF3603</i>	CA5073	unknown function	1.51	2.85
<i>IPF3621</i>	CA4340	unknown function	1.55	2.84
<i>IPF4899</i>	CA2129	unknown function	1.64	2.99
<i>IPF6108</i>	CA3073	putative tricarboxylate carrier	1.69	1.43
<i>IPF662</i>	CA6001	unknown function	2.32	5.07
<i>IPF8069</i>	CA1399	unknown function	3.96	2.96
<i>IPF823</i>	CA5366	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	1.52	1.05
<i>IPF8746</i>	CA1548	putative alpha-1,3-mannosyltransferase	1.52	2.96
<i>IPF8810</i>	CA3312	unknown function	1.59	2.84

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

<i>IPF8921.5EOC</i>	CA3125	unknown function	2.11	1.43
<i>KIP3</i>	CA5651	kinesin-related protein required for nuclear migration	1.64	1.43
<i>LIP6</i>	CA4756	Secretory lipase	1.92	2.85
<i>MIS11</i>	CA2250	mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase precursor	1.62	2.84
<i>MSB3</i>	CA2717	GTPase-activating protein for Sec4p	2.65	1.43
<i>NUP49</i>	CA5273	nuclear pore protein	1.51	1.05
<i>PRY2</i>	CA5344	putative pathogen related proteins	1.89	1.43
<i>PWP2</i>	CA5466	periodic tryptophan protein	3.35	2.84
<i>RNR21</i>	CA4155	ribonucleoside-diphosphate reductase	1.56	1.05
<i>RPL14B.3</i>	CA3602	ribosomal protein L14B, 3-prime end	1.62	2.84
<i>SGD1.3F</i>	CA2034	Involved in HOG pathway, 3-prime end	1.85	4.02
<i>SHM2</i>	CA0895	serine hydroxymethyltransferase precursor, mitochondrial	1.72	2.84
<i>SNF31</i>	CA5605	High-affinity glucose transporter	1.53	1.43

## Herunterregulierte Gene

### Glykolyse

<i>ENO1</i>	CA3874	enolase I (2-phosphoglycerate dehydratase)	0.63	1.43
<i>GAP1</i>	CA5892	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.42	1.05
<i>GLK1</i>	CA0263	aldohexose specific glucokinase	0.46	1.05
<i>GPM1</i>	CA4671	phosphoglycerate mutase	0.62	1.05
<i>HXK2.3F</i>	CA0127	hexokinase II, 3-prime end	0.48	1.05
<i>PFK1</i>	CA1834	6-phosphofructokinase, alpha subunit	0.65	1.05
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	0.57	1.05
<i>PGII</i>	CA3559	glucose-6-phosphate isomerase	0.66	2.85
<i>PGK1</i>	CA1691	phosphoglycerate kinase	0.42	1.43
<i>TPI1</i>	CA5950	triose phosphate isomerase	0.55	1.05

### Reservekohlenhydratstoffwechsel

<i>GPH1</i>	CA5206	glycogen phosphorylase	0.56	1.05
<i>GSY1</i>	CA5467	glycogen synthase	0.67	1.05
<i>IPF8321</i>	CA2938	similar to <i>S. cerevisiae</i> Glg2p	0.58	1.43
<i>TPS1</i>	CA4084	trehalose-6-phosphat synthase	0.66	2.96
<i>TPS2</i>	CA5066	threalose-6-phosphate phosphatase	0.50	1.05

### Metabolismus

<i>ADH5</i>	CA2391	probable alcohol dehydrogenase	0.57	1.05
<i>GDH2</i>	CA1775	NAD-specific glutamate dehydrogenase (NAD)	0.68	1.43
<i>FAS1</i>	CA5426	fatty-acyl-CoA synthase, beta chain	0.43	2.84
<i>FAS2.3F</i>	CA6107	fatty-acyl-CoA synthase, alpha chain, 3-prime end	0.68	1.43

### Zellwand und Transporter

<i>ALS1.3EOC</i>	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	0.21	1.05
<i>ALS10</i>	CA0448	agglutinin like protein	0.52	2.84
<i>ALS12.3F</i>	CA0413	agglutinin-like protein, 3-prime end	0.33	1.05
<i>ALS4.3F</i>	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	0.34	1.05
<i>ECE1</i>	CA1402	cell elongation Protein	0.63	2.84
<i>IPF5185 (FLO1)</i>	CA1678	putative cell wall protein	0.43	1.05

### Stressproteine

<i>DDR48</i>	CA4336	stress protein	0.53	1.05
<i>HSP12</i>	CA0627	heat shock protein	0.64	1.05
<i>GPX2</i>	CA0558	glutathione peroxidase	0.63	1.05

### Transkriptionsfaktoren

<i>EFG1</i>	CA2787	enhanced filamentous growth factor	0.69	2.84
<i>TYE7</i>	CA3707	basic helix-loop-helix transcription factor	0.59	1.05

**Unbekannte und Unklassifizierte**

<i>APR1</i>	CA4476	aspartyl protease	0.60	2.84
<i>ARC40</i>	CA3549	subunit of the Arp2/3 complex involved in the control of actin polymerization	0.66	2.84
<i>CYB1</i>	CA4553	G2/Mitotic-specific cyclin	0.57	2.84
<i>FCR1</i>	CA5890	zinc cluster transcription factor	0.63	2.84
<i>IPF10662</i>	CA3827	unknown function	0.22	1.05
<i>IPF11713</i>	CA1330	unknown function	0.52	1.05
<i>IPF11858</i>	CA1411	unknown function	0.62	1.47
<i>IPF15604</i>	CA0457	transcription factor	0.64	2.85
<i>IPF1798</i>	CA5264	unknown function	0.60	1.05
<i>IPF18690</i>	CA1377	unknown function	0.67	1.43
<i>IPF19766</i>	CA2746	unknown function	0.52	1.43
<i>IPF3592</i>	CA5068	unknown function	0.65	1.05
<i>IPF3937</i>	CA1203	unknown function	0.61	1.05
<i>IPF3964</i>	CA4111	unknown function	0.67	2.84
<i>IPF4303</i>	CA4245	unknown function	0.48	1.43
<i>IPF4696</i>	CA4970	unknown function	0.58	1.43
<i>IPF5806</i>	CA4216	unknown function	0.47	1.05
<i>IPF6881</i>	CA2186	putative phosphatidyl synthase	0.65	2.85
<i>IPF7109</i>	CA5650	unknown function	0.53	1.05
<i>IPF7666</i>	CA1120	unknown function	0.57	1.05
<i>IPF8762</i>	CA4220	unknown function	0.68	1.05
<i>IPF9550</i>	CA4570	similar to <i>S. cerevisiae</i> Osm1p	0.63	1.43
<i>NDH1</i>	CA4633	mitochondrial NADH dehydrogenase	0.50	2.84
<i>SAP5</i>	CA2499	secreted aspartyl proteinase 5	0.57	2.84
<i>SEC61</i>	CA3197	ER protein-translocation complex subunit	0.61	1.43
<i>SNF4</i>	CA0122	nuclear regulatory protein	0.67	1.05
<i>SRP72</i>	CA2519	signal recognition particle protein SRP72	0.65	2.84
<i>STF2</i>	CA2738	ATP synthase regulatory factor	0.53	1.05
<i>TUB1.3</i>	CA5546	alpha-1 tubulin, 3-prime end	0.56	2.84
<i>UGPI</i>	CA0435	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.64	1.05

Tab. 21: Regulierte Gene bei Überexpression von *EFG1* (Stamm CAI4 mit pRC2312P-H) im Vergleich zu einem Kontrollstamm (Stamm CAI4 mit pBI-1) (85 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 4,9 %). Die Zellen wurden in *PCK1p*-induzierendem SCAA Medium angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Metabolismus</b>				
<i>ACH1</i>	CA0345	acetyl-coenzyme-A hydrolase	1.5	0.45
<i>ACS1</i>	CA0848	acetyl-coenzyme-A synthetase	1.8	0.45
<i>ACS2</i>	CA2858	acetyl-coenzyme-A synthetase	1.5	0.45
<i>ADH5</i>	CA2391	probable alcohol dehydrogenase	1.5	4.95
<i>FBA1</i>	CA5180	fructose-bisphosphate aldolase	1.5	0.76
<b>Zellwand und Transporter</b>				
<i>ALS10</i>	CA0448	agglutinin like protein	2.5	0.45
<i>ECE1</i>	CA1402	cell elongation Protein	1.7	0.45
<i>HWP1</i>	CA2825	hyphal wall protein	19.1	0.45
<i>PHR1</i>	CA4857	GPI-anchored pH responsive glycosyl transferase	1.5	1.25
<i>RBT1</i>	CA2830	repressed by Tup1 protein	2.9	0.45
<b>Stressproteine</b>				
<i>DDR48</i>	CA4336	stress protein	2.1	0.45
<i>IPF1222</i>	CA4836	similar to superoxide dismutase	6.7	0.45
<b>Unbekannt und Unklassifiziert</b>				
<i>ADO1</i>	CA0685	adenosine kinase	1.6	0.45
<i>CHT2</i>	CA1051	chitinase 2 precursor	1.6	0.45
<i>CTR1</i>	CA1496	copper transport protein	1.6	0.45
<i>EGD2</i>	CA2956	nascent polypeptide associated complex protein alpha subunit	1.5	2.07
<i>FET34.3EOC</i>	CA1431	iron transport multicopper oxidase, 3-prime end	1.7	0.45
<i>FET5</i>	CA2920	multicopy oxidase	1.9	0.45
<i>FRE30.53</i>	CA3415	strong similarity to ferric reductase, internal fragment	1.6	0.45
<i>FRP2</i>	CA3153	member of the FRP family of proteins related to <i>Yarrowia lipolytica</i> glyoxylate pathway regulator Gpr1p and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fun34p	1.6	0.45
<i>IFE2</i>	CA2075	unknown function	1.6	0.45
<i>IPF15604</i>	CA0457	transcription factor	1.7	4.95
<i>IPF15781</i>	CA1238	unknown function	1.6	0.45
<i>IPF15870</i>	CA2769	unknown function	1.5	0.45
<i>IPF4450</i>	CA0684	unknown function	1.5	0.76
<i>IPF5196</i>	CA1672	unknown function	1.5	4.48
<i>IPF5198</i>	CA1128	unknown function	1.6	4.95
<i>MET10</i>	CA1620	sulfite reductase flavin-binding subunit	1.5	0.76
<i>MET15</i>	CA2565	O-acetylhomoserine O-acetylserine sulphydrylase	1.6	0.45
<i>MET6</i>	CA0653	methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	1.8	0.45
<i>RIB7</i>	CA3495	HTP reductase	1.6	1.25
<i>YKE2.3</i>	CA3842	Gim complex component, 3-prime end	1.5	0.45

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

## Herunterregulierte Gene

**Zellwand und Transporter**

<i>ALSI.3EOC</i>	CA0316	agglutinin-like protein, 3-prime end	0.61	0.76
<i>STL1</i>	CA0472	sugar transporter	0.65	0.76

**Sekretiere Proteasen**

<i>SAP1</i>	CA2660	secreted aspartyl proteinase	0.67	4.60
<i>SAP2</i>	CA3138	aspartic protease	0.63	4.26
<i>SAP4</i>	CA2055	secreted aspartyl proteinase	0.60	1.25

**Unbekannte und Unklassifizierte**

<i>APN2</i>	CA2370	AP endonuclease, exonuclease III homologue	0.66	4.26
<i>ARO4</i>	CA1484	3-dehydro-deoxyphosphoheptonate aldolase, tyrosine-inhibited	0.67	3.10
<i>DAL52</i>	CA2478	allantoate permease	0.67	4.71
<i>DYN2.3</i>	CA4550	dynein light chain 1, cytosolic, 3-prime end	0.62	0.45
<i>FRE7</i>	CA5621	ferric reductase transmembrane component	0.50	0.76
<i>GIM5</i>	CA2888	Gim complex component	0.62	3.90
<i>HIS6</i>	CA1480	5 Pro-FAR isomerase	0.56	3.10
<i>IFA2</i>	CA0335	unknown function	0.61	3.10
<i>IFF10.5</i>	CA5763	unknown function	0.59	1.50
<i>IPF10864</i>	CA1968	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rex4p	0.63	3.90
<i>IPF10884</i>	CA1747	unknown function	0.58	2.07
<i>IPF11694</i>	CA0164	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tna1p	0.66	4.60
<i>IPF11766</i>	CA0890	unknown function	0.62	2.07
<i>IPF1261</i>	CA5668	unknown function	0.65	3.90
<i>IPF12662</i>	CA0973	unknown function	0.51	3.10
<i>IPF12676</i>	CA1681	unknown function	0.65	0.76
<i>IPF13139</i>	CA3759	unknown function	0.58	2.07
<i>IPF13626</i>	CA2890	putative methyltransferase	0.55	3.10
<i>IPF13667</i>	CA3673	unknown function	0.55	0.76
<i>IPF15575</i>	CA1482	unknown function	0.58	2.22
<i>IPF1882</i>	CA6140	unknown function	0.67	3.10
<i>IPF19195.3F</i>	CA0144	putative amino acid or GABA permease, 3-prime end	0.41	3.10
<i>IPF19974</i>	CA3178	unknown function	0.67	2.07
<i>IPF19980</i>	CA3245	putative lipase	0.66	3.90
<i>IPF2053</i>	CA4983	unknown function	0.66	0.76
<i>IPF2167</i>	CA5310	unknown function	0.56	2.22
<i>IPF2334</i>	CA5199	unknown function	0.60	3.90
<i>IPF3101</i>	CA4654	unknown function	0.61	1.50
<i>IPF3239</i>	CA2472	unknown function	0.65	3.10
<i>IPF4704</i>	CA4974	unknown function	0.65	2.07
<i>IPF5673</i>	CA1103	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rex3p	0.67	4.95
<i>IPF5865</i>	CA2132	unknown function	0.60	3.90
<i>IPF6889</i>	CA3326	unknown function	0.57	2.07
<i>IPF721.3F</i>	CA5517	unknown function	0.66	1.50
<i>IPF7493</i>	CA3241	putative permease	0.62	0.45
<i>IPF7819</i>	CA3563	unknown function	0.65	2.07
<i>IPF9825</i>	CA3089	unknown function	0.63	3.10
<i>MSC2</i>	CA3565	probable membrane protein	0.66	3.10
<i>MYO1</i>	CA3233	myosin-1 isoform (type II myosin) heavy chain	0.60	4.60
<i>NMT1</i>	CA1063	N-myristoyltransferase	0.56	3.90
<i>PET127</i>	CA3308	component of mitochondrial translation	0.61	2.07
<i>PHO11</i>	CA0616	secreted acid phosphatase	0.61	2.07
<i>RRS1</i>	CA2992	regulator for ribosome synthesis	0.61	3.10

---

<i>RTA1</i>	CA0401	unknown function	0.66	4.60
<i>SAS2</i>	CA4814	Zinc finger protein involved in silencing	0.33	4.71
<i>TOA1</i>	CA2767	transcription initiation factor IIA	0.66	4.60
<i>URA2.5EOC</i>	CA1315	multifunctional pyrimidine biosynthesis protein	0.65	0.45
<i>YSA1</i>	CA5909	sugar-nucleotide hydrolase	0.65	2.73

Tab. 22: Regulierte Gene bei Überexpression von *EFH1* (Stamm CAI4 mit pDB35) im Vergleich zu einem Kontrollstamm (Stamm CAI4 mit pBI-1) (81 Gene bei einer FDR<sup>1</sup> von 5,5 %). Die Zellen wurden in *PCK1p*-induzierendem SCAA Medium angezogen.

Gen-Name	Gen-Nummer	Beschreibung (nach CandidaDB: <a href="http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/">http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/</a> )	-fache regulation	q-Wert <sup>2</sup>
<b>Hochregulierte Gene</b>				
<b>Metabolismus</b>				
<i>ACSI</i>	CA0848	acetyl-coenzyme-A synthetase	1.9	0.89
<i>ADH5</i>	CA2391	probable alcohol dehydrogenase	2.0	0.89
<i>MET13</i>	CA2785	methylene tetrahydrofolate reductase	1.6	0.89
<i>MET6</i>	CA0653	methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	2.2	0.89
<i>PDC11</i>	CA2474	pyruvate decarboxylase	1.5	0.89
<i>PFK2</i>	CA3112	6-phosphofructokinase, beta subunit	1.7	3.72
<b>Zellwand und Transporter</b>				
<i>ALS10</i>	CA0448	agglutinin like protein	1.5	0.89
<i>ECE1</i>	CA1402	cell elongation protein	2.2	0.89
<i>HWP1</i>	CA2825	hyphal wall protein	3.0	0.89
<i>HYR1.53</i>	CA0557	hyphally regulated protein	1.7	0.89
<b>Stressproteine</b>				
<i>SOD22.3F</i>	CA5588	superoxide dismutase, 3-prime end	1.9	0.89
<i>YHB1</i>	CA0943	flavo-hemoglobin	2.5	0.89
<b>Transkriptionsfaktoren</b>				
<i>EFH1</i>	CA2672	transcription regulator	1.6	0.89
<i>IPF15604</i>	CA0457	transcription factor	2.3	3.72
<b>Unbekannte und Unklassifizierte</b>				
<i>CAR2</i>	CA2561	ornithine aminotransferase	1.5	0.89
<i>CLN21</i>	CA1582	G1 cyclin	1.5	4.73
<i>CSE1.3F</i>	CA2982	importin-beta-like protein, 3-prime end	1.5	4.73
<i>DOC1</i>	CA0002	component of the anaphase promoting complex	1.7	0.89
<i>GIT1</i>	CA3615	glycerophosphoinositol transporter	1.5	4.73
<i>GLC3</i>	CA2758	1,4-glucan branching enzyme	1.7	2.12
<i>IFG3.3</i>	CA5402	probable d-amino acid oxidase, 3-prime end	1.6	0.89
<i>IPF10645</i>	CA1944	unknown function	1.7	4.07
<i>IPF10651</i>	CA3823	unknown function	1.6	2.72
<i>IPF10662</i>	CA3827	unknown function	1.5	2.12
<i>IPF1067</i>	CA5757	putative glutamate decarboxylase	1.7	0.89
<i>IPF11344</i>	CA1341	unknown function	1.8	1.47
<i>IPF11363</i>	CA2802	unknown function	1.6	0.89
<i>IPF12253</i>	CA4727	unknown function	1.9	1.47
<i>IPF12312</i>	CA1099	unknown function	1.7	4.73
<i>IPF13467</i>	CA3768	putative peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	1.8	0.89
<i>IPF15543</i>	CA5654	unknown function	1.5	3.72
<i>IPF16253</i>	CA0782	unknown function	1.9	1.84
<i>IPF1833</i>	CA6162	similar to opaque phase protein OP4	1.6	2.72
<i>IPF1837</i>	CA6159	unknown function	1.6	2.72
<i>IPF4902</i>	CA0897	unknown function	1.5	0.89

<sup>1</sup>FDR: „false discovery rate“: Prozentsatz nicht-signifikant regulierter Gene

<sup>2</sup>q-Wert: bezeichnet die niedrigste FDR, bei der das Gen als „signifikant reguliert“ bezeichnet wird.

<i>IPF4972</i>	CA0461	unknown function	1.7	1.84
<i>IPF525</i>	CA5613	unknown function	2.8	0.89
<i>IPF5806</i>	CA4216	unknown function	1.9	0.89
<i>IPF635</i>	CA6013	unknown function	1.6	3.72
<i>IPF6662</i>	CA4288	similar to <i>S. cerevisiae</i> Isy1p	1.7	4.07
<i>IPF7715</i>	CA0706	unknown function	1.6	4.73
<i>IPF7717</i>	CA4058	unknown function	1.8	0.89
<i>IPF7970</i>	CA3259	unknown function	1.7	4.73
<i>IPF8321</i>	CA2938	similar to <i>S. cerevisiae</i> Glg2p	1.9	0.89
<i>IPF8814</i>	CA3315	unknown function	1.5	2.12
<i>IPF9238</i>	CA3412	Long chain fatty alcohol oxidase	1.5	3.72
<i>IPF995</i>	CA5155	unknown function	2.6	4.07
<i>LOC1</i>	CA3997	putative double-stranded RNA-binding protein	1.6	4.73
<i>NIT3</i>	CA2338	nitrilase	1.6	2.12
<i>RIB4.3</i>	CA0054	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase, 3-prime end	1.6	2.72
<i>SEC24</i>	CA0958	component of COPII coat of ER-Golgi vesicles	1.6	3.72
<i>STF2</i>	CA2738	ATP synthase regulatory factor	1.5	2.72
<i>UBC9</i>	CA5109	E2 ubiquitin-conjugating enzyme	1.8	0.89

## Herunterregulierte Gene

### Zellwand und Transporter

<i>ALS4.3F</i>	CA1528	agglutinin-like protein, 3-prime end	0.48	0.89
<i>HGT11</i>	CA1506	hexose transporter	0.36	0.89
<i>HGT12</i>	CA4038	hexose transporter	0.36	0.89
<i>IPF331</i>	CA5873	GPI-anchored cell surface protein	0.54	0.89
<i>IPF5185 (FLO1)</i>	CA1678	putative cell wall protein	0.40	0.89
<i>IPF7493</i>	CA3241	putative permease	0.45	0.89
<i>IPF4181</i>	CA5798	putative permease	0.57	0.89
<i>JEN1</i>	CA5737	carboxylic acid transporter protein	0.63	1.47
<i>JEN2</i>	CA5478	carboxylic acid transporter protein	0.56	0.89

### Unbekannte und Unklassifizierte

<i>ARG81.3EOC</i>	CA2624	transcription factor possibly involved in arginine metabolism, 3-prime end	0.61	3.72
<i>CMK1</i>	CA6135	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent ser/thr protein kinase	0.65	0.89
<i>FRP1</i>	CA3813	member of the FRP family of proteins related to Y. lipolytica glyoxylate pathway regulator Gpr1p and <i>S. cerevisiae</i> Fun34p	0.37	0.89
<i>FUN34.5EOC</i>	CA3154	unknown function	0.59	1.47
<i>GAL10</i>	CA4041	UDP-glucose 4-epimerase by homology	0.65	0.89
<i>GCD2</i>	CA5929	Translation initiation factor eIF2B	0.66	4.73
<i>HEM14</i>	CA1951	Mitochondrial protoporphyrinogen oxidase	0.65	2.72
<i>IMH3.EXON2</i>	CA1245	IMP dehydrogenase, exon 2	0.61	0.89
<i>IPF11182.3EOC</i>	CA0174	unknown function	0.65	2.72
<i>IPF12540</i>	CA2974	unknown function	0.60	0.89
<i>IPF1390</i>	CA5093	unknown function	0.63	4.80
<i>IPF14710</i>	CA1080	unknown function	0.64	3.72
<i>IPF17283</i>	CA2021	unknown function	0.65	1.47
<i>IPF4182</i>	CA5797	unknown function	0.64	0.89
<i>IPF4859</i>	CA3700	unknown function	0.65	0.89
<i>IPF5330</i>	CA1339	unknown function	0.65	2.72
<i>IPF6105</i>	CA3075	similar to <i>S. cerevisiae</i> Gua1p GMP synthase	0.60	2.72
<i>RRP6</i>	CA2593	involved in 5.8S rRNA processing	0.65	2.72
<i>TIM23</i>	CA3130	mitochondrial inner membrane import translocase	0.61	4.73

## **Danksagung**

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, sowie die vielen Anregungen und Ideen während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. E. Knust möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korefferats bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere der AG Ernst und den „Mensagängern“, danke ich für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und für die lustigen Unternehmungen.

Bernd Tebarth danke ich für die Zusammenarbeit beim Scannen der Microarrays.

Ein herzliches Danke Schön an Klaus Lengeler, Yvonne Weber sowie Stephan Prill für die Durchsicht des Manuskripts.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter, die es mir ermöglicht hat, mein Studium auf diese Weise abzuschließen und mich über die gesamte Zeit sowohl finanziell als auch ideell unterstützt hat. Vielen herzlichen Dank auch an Leni, für die Bereitstellung ihres Computers sowie vor allem für die seelische Unterstützung und schönen Ablenkungen.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe. Sie wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, Dezember 2003

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

**Bernd Tebarth, Thomas Doedt, Shankarling Krishnamurthy, Mirko Weide, Freida Monterola, Angel Dominguez und Joachim F. Ernst (2003)**

Adaptation of the Efg1p Morphogenetic Pathway in *Candida albicans* by Negative Autoregulation and PKA-dependent Repression of the *EFG1* Gene

*Journal of Molecular Biology* (329) 949-962

**Thomas Doedt, Shankarling Krishnamurthy, Dirk Bockmühl, Bernd Tebarth, Christian Stempel, Claire Russell, Alistair J. P. Brown und Joachim F. Ernst (2003)**

APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*.

(*Molecular Biology of the Cell*, eingereicht)