

AGC-Kinase-Netzwerk in *Candida albicans*

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Alida Eleonore Schäkel
aus Mainz

Düsseldorf, September 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. J. F. Ernst
Koreferent: Prof. Dr. W. Däubener

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2013

1	Einleitung	1
1.1	Proteinkinasen	1
1.1.1	AGC-Kinasen	1
1.2	Der humanpathogene Pilz <i>C. albicans</i>	3
1.2.1	Genomanalyse	4
1.2.2	Morphologie und ihr Einfluss auf die Virulenz	5
1.2.3	Hypoxische Anpassung	7
1.2.4	Regulation der Hyphenbildung bei Normoxie	9
1.2.5	Regulation der Hyphenbildung bei Hypoxie	12
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	Materialien und Methoden	16
2.1	Chemikalien, Gase und Enzyme	16
2.2	Stämme und Medien	16
2.2.1	<i>E. coli</i> -Stämme	16
2.2.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	16
2.2.3	<i>C. albicans</i> -Stämme	17
2.2.4	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	19
2.2.5	Medien zur Anzucht von Hefen	19
2.2.6	Selektion Uridin-auxotropher Mutanten von <i>C. albicans</i>	19
2.2.7	Medien zur Hypheninduktion von <i>C. albicans</i>	20
2.3	Anzucht von <i>C. albicans</i> -Stämmen	20
2.3.1	Inkubation von <i>C. albicans</i> unter normoxischen Bedingungen	20
2.3.2	Inkubation von <i>C. albicans</i> unter hypoxischen Bedingungen	20
2.4	Plasmide und Primer	20
2.4.1	Plasmide	20
2.4.2	Primer	22
2.5	Transformation	23
2.5.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
2.5.2	Herstellung chemisch-kompenter <i>E. coli</i> -Zellen (RbCl-Methode)	24
2.5.3	Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.5.3.1	Elektroporation	24
2.5.3.2	Chemische Transformation	24
2.5.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.5.5	Transformation von <i>C. albicans</i>	25
2.6	Präparation und Analyse von Nukleinsäuren	25
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	26
2.6.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	26
2.6.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i>	26
2.6.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese	27
2.6.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.6.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	27

2.6.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.6.9	Restriktion von DNA	28
2.6.10	DNA-Sequenzierung.....	28
2.6.11	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
2.6.11.1	Standard-PCR.....	28
2.6.11.2	Kolonie-PCR	28
2.6.11.3	Quantitative Real-Time-PCR.....	28
2.6.11.3.1	DNase-Behandlung.....	29
2.6.11.3.2	cDNA-Synthese	29
2.6.11.3.3	Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR	29
2.6.12	Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen durch Southern-Blot-Analyse.....	31
2.6.12.1	DNA-Restriktion.....	31
2.6.12.2	Sondenmarkierung	31
2.6.12.3	Transfer auf eine Nylonmembran durch Kapillar-Blot.....	31
2.6.12.4	Hybridisierung und Detektion	32
2.7	Biochemische Methoden	32
2.7.1	Isolation von Rohextrakten aus <i>C. albicans</i>	32
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	33
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.7.4	Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse.....	33
2.7.5	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	34
2.7.6	ChIP-chip.....	35
2.7.7	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay-Assay“).	37
2.8	Zellbiologische Methoden.....	37
2.8.1	Immunfluoreszenz	37
2.8.1.1	Fixieren der Zellen.....	37
2.8.1.2	Herstellung der Präparate	37
2.8.1.3	Mikroskopie der Präparate	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Markierung von Tpk1, Tpk2, Sch9 und Bcy1 mit einem HA-Epitop.....	39
3.1.1	Produktion der Epitop-markierten AGC-Kinasen	42
3.1.2	Funktionalitätsanalysen der Epitop-markierten Proteine	43
3.2	Zelluläre Lokalisation der AGC-Kinasen	47
3.3	Chromosomale Lokalisation der AGC-Kinasen.....	49
3.3.1	ChIP-chip-Analysen zur Bindung der PKA unter Hefewachstumsbedingungen	49
3.3.1.1	Genomweite Zielsequenzen von Tpk1, Tpk2 und der regulatorischen Untereinheit Bcy1.....	53
3.3.1.2	Bindung von Tpk2 an den <i>EFG1</i> -ORF.....	54
3.3.1.3	Identifizierung von PKA-Konsensus-Bindesequenzen unter Hefewachstumsbedingungen.....	55
3.3.2	ChIP-chip-Analysen zur Bindung der PKA-Isoformen unter Hypheninduktionsbedingungen	57

3.3.2.1	Genomweite Zielsequenzen von Tpk1 und Tpk2	59
3.3.2.2	Bindung von Tpk1 an den <i>EFG1</i> -Promotor 30 min nach Hypheninduktion	61
3.3.2.3	Analyse zur Identifizierung von PKA-Konsensus-Bindesequenzen unter Hypheninduktionsbedingungen	63
3.3.3	Transkriptspiegel von potentiellen PKA-Zielgenen.....	64
3.3.4	ChIP-chip-Analysen zur Ermittlung von genomweiten Zielsequenzen von Sch9	69
3.4	Hypoxischer Signalweg von Sch9	72
3.4.1	Konstruktion einer <i>sch9 rim15</i> - Doppelmutante.....	72
3.4.2	Morphologische Untersuchung der <i>sch9 rim15</i> - Doppelmutante	75
3.4.3	Einfluss von Rapamycin und Koffein auf die Zellmorphologie	75
3.4.4	Untersuchung bekannter Komponenten der Hyphenregulation auf <i>sch9</i> -Phänotyp	77
3.4.5	Einfluss von Farnesol auf den <i>sch9</i> -Phänotypen	80
3.4.6	Suche nach weiteren Mutanten mit <i>sch9</i> -Phänotyp	81
3.4.7	Epistase-Untersuchungen zur Komplementation des <i>sch9</i> -Phänotyps	84
3.5	Suche nach neuen Interaktionspartnern von Sch9 in <i>C. albicans</i>	86
4	Diskussion	91
4.1	Zelluläre Lokalisation der AGC-Kinasen	92
4.2	Tpk1 und Tpk2 haben chromosomale Binderegionen unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen.....	94
4.3	Eine Promotorlokalisierung von Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen korreliert mit dem Transkriptspiegel.....	99
4.4	Tpk1 ist ein Repressor der <i>SSD1</i> -Transkription.....	100
4.5	Regulation von <i>EFG1</i> durch Tpk1 und Tpk2	101
4.6	Sch9 ist ein Zentromer-assoziiertes Protein in <i>C. albicans</i>	103
4.7	Der Einfluss von Sch9 auf das Zellwachstum	104
4.8	Die Regulation der Hyphenbildung unter Hypoxie, erhöhten CO ₂ -Konzentrationen und Temperaturen < 37 °C.....	105
4.8.1	Einfluss der Komponenten des HOG-Signalweges	106
4.8.2	Der Tor1-Sch9-Signalweg reguliert zusammen mit dem PKA-Signalweg die Hyphenbildung	107
4.8.3	Eine Überexpression von <i>RAS1</i> oder <i>TPK2</i> supprimiert den <i>sch9</i> -Phänotypen	109
5	Zusammenfassung	111
6	Summary.....	112
7	Literaturverzeichnis.....	113
8	Abkürzungsverzeichnis	126
9	Anhang.....	129
9.1	Nukleotidsequenzen der Bankplasmide	158

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

Die Phosphorylierung stellt einen der wichtigsten Regulationsmechanismen von Proteinen dar, der durch die Aktivierung von Proteinkinasen ermöglicht wird. Proteinkinasen sind regulatorische Enzyme, die ihr Substrat durch das Anhängen von Phosphatgruppen modifizieren. Die Klassifizierung der Proteinkinasen erfolgt nach der Aminosäure, welche sie phosphorylieren; die wichtigsten Gruppen sind Serin/Threonin-, Tyrosin- und Histidinkinasen (Belham *et al.*, 1999; Pearce *et al.*, 2010). Die Gesamtheit aller Proteinkinasen innerhalb eines Organismus wird als Kinom bezeichnet. Das humane Kinom besteht aus 518 Kinasen und somit kodieren 1,7 % der humanen Gene für Proteinkinasen, wodurch sie eine der größten und meist untersuchten Genfamilien des humanen Genoms darstellen (Manning *et al.*, 2002). Durch die Phosphorylierung modifizieren die Proteinkinasen die Lokalisation und Aktivität von bis zu 30 % aller zellulären Proteine und regulieren zelluläre Prozesse wie den Metabolismus, die Transkription, den Verlauf des Zellzyklus, die Apoptose und die Differenzierung (Manning *et al.*, 2002; Manning, 2005).

1.1.1 AGC-Kinasen

60 der 518 Proteinkinasen des Menschen sind AGC-Kinasen (Pearce *et al.*, 2010). Basierend auf einer Sequenzanalyse der katalytischen Domäne wurden 1995 die AGC-Kinasen als Subgruppe der Proteinkinasen definiert (Hanks und Hunter, 1995). AGC-Kinasen sind hochkonservierte Serin/Threoninkinasen, die nach der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) und der Proteinkinase C (PKC) benannt wurden (Pearce *et al.*, 2010). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen eine hochkonservierte Kinasedomäne, die wie bei anderen eukaryotischen Proteinkinasen (ePKs) aus zwei Bereichen besteht. Die kleinere N-terminale Region kann Nukleotide binden, während die C-terminale Region für die Substratbindung und Katalyse benötigt wird (Jacinto und Lorberg, 2008). Da AGC-Kinasen Prozesse wie das Zellwachstum, die Proliferation und das Überleben der Zelle kontrollieren, unterliegen sie strengen Regulationsmechanismen. Die Regulation folgt dabei einem generellen Schema. Zunächst wird die sogenannte Aktivierungsschleife (oder auch „T-loop“), welche innerhalb der Kinasedomäne liegt, phosphoryliert (Kannan *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung erfolgt an der Konsensussequenz

T*FCGT (* = phosphorylierte Aminosäure) und kann durch andere Kinasen oder Autophosphorylierung erfolgen.

Viele AGC-Kinasen weisen an ihrem C-Terminus zusätzliche Motive auf, die phosphoryliert werden können (Abb. 1.1). Beispielsweise besitzen die meisten AGC-Kinasen ein hydrophobes Motiv (HM) mit der Konsensussequenz FXXFS/T*Y/F. Ist dieses Motiv phosphoryliert, dient es als Andockstelle für die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (Pdk1), welche ebenfalls zu den AGC-Kinasen gehört. Nachdem Pdk1 an das HM gebunden hat, wird die Aktivierungsschleife phosphoryliert. Es wird angenommen, dass die meisten AGC-Kinasen von Pdk1 aktiviert werden, da so gut wie alle Mitglieder dieser Proteinfamilie ein HM besitzen. Die Phosphorylierung des HMs ist außerdem wichtig, da sie die Stabilität der AGC-Kinase erhöht (Jacinto und Lorberg, 2008; Belham *et al.*, 1999). Viele AGC-Kinasen besitzen außerdem ein sogenanntes „turn-Motiv“ (TM), welches die Integrität des Proteins aufrecht erhält, indem es beispielsweise die Dephosphorylierung des HMs verhindert (Pearce *et al.*, 2010).

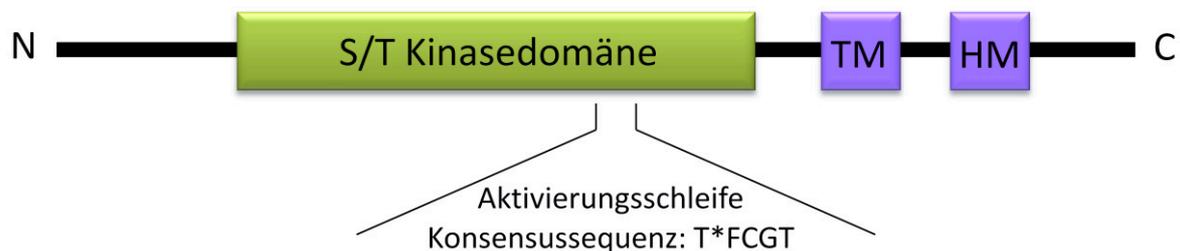


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Domänen von AGC-Kinasen. Die Aktivierung der AGC-Kinasen erfolgt innerhalb der Konsensussequenz der hochkonservierten Kinasedomäne. Weitere potentielle Phosphorylierungsstellen sind das hydrophobe Motiv (HM) oder das turn-Motiv (TM). * = phosphorylierte Aminosäure.

In dieser Arbeit wurde mit dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* gearbeitet, welcher in enger phylogenetischer Beziehung zu dem eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* steht (Odds, 1988). *S. cerevisiae* besitzt 117 ePKs und 10 weitere atypische Proteinkinasen, wobei ungefähr 20 der ePKs zu den AGC-Kinasen gehören (Jacinto und Lorberg, 2008). In dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* konnten bereits einige homologe AGC-Kinasen identifiziert werden, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

1.2 Der humanpathogene Pilz *C. albicans*

C. albicans ist ein fakultativ humanpathogener Hefepilz, der zu den Ascomycota (Schlauchpilzen) zählt. Er gilt als bedeutendster Erreger humaner Mykosen, obwohl er im Falle eines intakten Immunsystems lediglich als Kommensale auftritt. *C. albicans* kann in 75 % der Bevölkerung auf den Schleimhäuten des Oral- und Gastrointestinaltrakts sowie im Genitalbereich nachgewiesen werden (Ghannoum *et al.*, 2010). Neben oberflächlichen Mykosen kann *C. albicans* in immunsupprimierten Menschen lebensbedrohliche, systemische Mykosen verursachen. Eine Immunsuppression kommt z.B. bei Transplantationen von Organen, bei Chemotherapie oder durch eine HIV-Infektion zu Stande. In diesem Falle breitet sich der Pilz über den Blutkreislauf aus und befällt innere Organe, was in 40 % der Fälle tödlich verläuft (Greenspan und Greenspan, 1996; Wey *et al.*, 1988). Eine invasive Mykose entsteht hauptsächlich durch eine endogene Infektion bei bestehender Kolonisation (Reagan *et al.*, 1990). Eine systemische Mykose kann ebenfalls durch exogene Faktoren verursacht werden, da *C. albicans* in der Lage ist, Biofilme auf der Oberfläche von Kathetern und Prothesen zu bilden. Diese Biofilme sind mehrschichtige Zusammenschlüsse von Zellen, die von einer polymeren Matrix umgeben sind. Die Bildung eines Biofilms spielt eine große Rolle in der Therapie der Pilzinfektion, da dadurch eine erhöhte Resistenz gegenüber Antimykotika entsteht (Douglas, 2003). Bei systemischen Mykosen ist *C. albicans* die am häufigsten isolierte *Candida*-Art, gefolgt von *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* (Pfaller, 1996). Mehr als 17 *Candida*-Spezies können zu invasiven Mykosen führen, jedoch werden 90 % der Mykosen durch diese fünf Spezies verursacht (Pfaller und Diekema, 2007). Der Nachweis einer *Candida*-Infektion kann durch kulturelle und nicht-kulturelle Verfahren erfolgen. Die Diagnose einer systemischen Mykose basiert z. Zt. meist noch auf der kulturellen Anzucht aus Körperflüssigkeiten oder Geweben. Das Ausmaß der Kolonisation wird durch den *Candida*-Kolonisationsindex (CCI) bestimmt. Dieser Wert ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl der Körperregionen, die mit *Candida* spp. kolonisiert sind und der Anzahl der getesteten Körperregionen pro Patient. Liegt der Wert über 0,5 liegt der Verdacht einer invasiven *Candida*-Infektion vor (Pittet *et al.*, 2004). Dabei geht man davon aus, dass das Infektionsrisiko mit der Anzahl der kolonisierten Körperregionen ansteigt. Weiterhin wurden sogenannte „*Candida* scores“ eingeführt, die Risikofaktoren einbeziehen, um die Patientengefährdung abzuschätzen (Leon *et al.*, 2006). Nicht-kulturelle Verfahren, die auf z.B. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) basieren,

erlauben eine Unterscheidung zwischen *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* und *C. krusei* innerhalb von wenigen Stunden (Shepard *et al.*, 2008). Infektionen mit *Candida* spp. können mit Antimykotika aus der Klasse der Azole, Echinocandine oder Polyene behandelt werden. Resistenzen gegenüber diesen Antimykotika haben einen immer größer werdenden Einfluss auf die Therapiemöglichkeiten (Sanglard und Odds, 2002). Dies erfordert eine verstärkte Untersuchung der zellulären Vorgänge in *C. albicans*.

1.2.1 Genomanalyse

Bei *C. albicans* handelt sich um einen diploiden Organismus, dessen Genom aus ca. 30 Megabasenpaaren besteht (15 Mbp pro Chromosomensatz). Obwohl *C. albicans* diploid ist, konnte bislang weder ein Vermehrungszyklus, noch Meiose nachgewiesen werden (Jones *et al.*, 2004). Das Genom ist auf acht Chromosomen verteilt, die mit 1-7 und R bezeichnet wurden (Doi *et al.*, 1992). Dabei wurden die Chromosomen entsprechend ihrer Größe durchnummeriert. Auf den beiden R-Chromosomen ist der ca. 700 kb große *RDN1*-Locus zu finden, welcher für die Gene der ribosomalen RNA kodiert. Dabei liegen die Gene für die 18S-, 5.8S-, 25S- und 5S-rRNA in einer 12 kb großen Einheit vor, die in ca. 55 Kopien tandemförmig wiederholt wird. Durch den diploiden Chromosomensatz ist es bei Mutationsanalysen erforderlich, beide Allele eines Gens zu deletieren. Für die Deletion beider Allele wird meistens die sogenannte „URA-Blaster“- oder die „URA-Flipper“-Methode angewandt (Fonzi und Irwin, 1993; Morschhäuser *et al.*, 1999). *URA3* kodiert für die Orotidin-5'-phosphat Decarboxylase und ist ein Virulenzfaktor (Brand *et al.*, 2004; Staab und Sundstrom, 2003). Bei der Herstellung von Mutantenstämmen aus auxotrophen Laborstämmen wie z.B. CAI4 oder BWP17 ist daher die Integration des *URA3*-Gens zu beachten. Weiterhin muss, besonders bei der Verwendung heterologer Reportergene, der alternative Kodongebrauch in *C. albicans* berücksichtigt werden. Das Basentriplett CUG wird nicht wie gewöhnlich in Leucin, sondern in Serin translatiert (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995).

1.2.2 Morphologie und ihr Einfluss auf die Virulenz

C. albicans wird als polymorpher Pilz bezeichnet, da er die Fähigkeit besitzt, unterschiedliche morphologische Erscheinungsformen einzunehmen (Abb. 1.2). So ist es dem Pilz möglich, reversible Übergänge zwischen der einzelligen Hefeform (Blastokonidie), Pseudohyphen, echten Hyphen und Chlamydosporen zu durchlaufen. Zusätzlich kommt eine Stäbchenform vor, die man als „opaque“ bezeichnet (im Gegensatz zu der „white“-Hefeform). Die verschiedenen Morphologien tragen zur Pathogenität bei und ermöglichen dem Pilz verschiedene Nischen im Wirt zu besiedeln und sich optimal anzupassen (Ernst, 2000). Der Wechsel zwischen der Hefe- und Hyphenform, der auch als Dimorphismus bezeichnet wird, gilt als wichtigste Virulenzeigenschaft des Pilzes (Odds, 1988). Die einzellige Hefe vermehrt sich durch Knospung und kann daher schnell über den Blutkreislauf im Körper des Wirtes vermehrt werden. Aus diesem Grund spielt diese Wuchsform gerade in der frühen Infektion eine wichtige Rolle (Saville *et al.*, 2003). Nachdem die Tochterzelle eine bestimmte Größe erreicht hat, trennt sie sich von der Mutterzelle und ist selbst zur Knospung bereit. Bei filamentösem Wachstum muss zwischen echten Hyphen und Pseudohyphen unterschieden werden. Echte Hyphen entstehen durch einen kontinuierlich apikal wachsenden Keimschlauch, der nachträglich durch Septen segmentiert wird. Pseudohyphen hingegen entstehen durch unipolare Knospung, wobei die elongierte Tochterzelle mit der Mutterzelle in Kontakt bleibt und wiederum Knospen bildet. Bei den dadurch entstandenen Zellketten sind Einschnürungen an den Zellverbindungen sichtbar (Odds, 1988; Ernst, 2000).

Die Ausbildung von Hyphen ermöglicht die Adhäsion sowie die Penetration von Epithel- und Endothelzellen des Wirtes (Odds, 1994). Die invasive Infektion wird durch die Expression von Virulenzfaktoren, wie z.B. Adhäsine oder Proteasen ermöglicht, die nur von Hyphen produziert werden. Ein weiterer Vorteil des Dimorphismus ist die Möglichkeit aus Immunzellen wie z.B. Makrophagen zu wachsen und somit dem Immunsystem zu entkommen. Der Pilz wächst durch die Bildung von Hyphen nicht nur aus der Immunzelle heraus, sondern beschädigt die Zelle dabei auch (Kumamoto und Vines, 2005; Lo *et al.*, 1997).

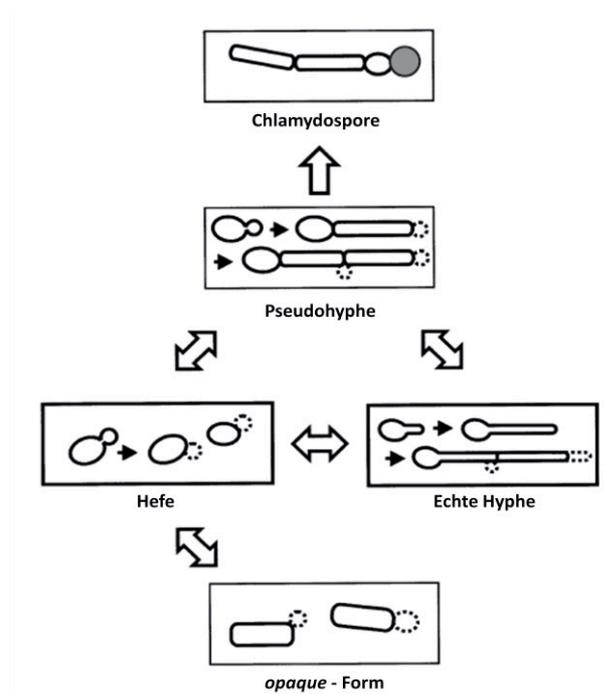


Abb. 1.2: Morphologische Erscheinungsformen von *C. albicans* (Ernst, 2000; modifiziert). Während einer Infektion kommen hauptsächlich die Hefe- und die Hyphenwachstumsformen vor. Die dickwandigen Chlamydosporen entstehen als terminale Zellen an Pseudohyphen. Die Hefezellen können in die stabförmige *opaque*-Form wechseln. Gepunktete Linien zeigen die Richtung des Zellwachstums oder Tochterzellen.

Der Wechsel von der Hefe- und Hyphenform wird durch die äußeren Bedingungen induziert. Im Labor ist es möglich, die Hefeform bei 30 °C zu kultivieren. Die Induktion des Hyphenwachstums kann durch Bedingungen erfolgen, die in inneren Organen des menschlichen Körpers vorkommen. So induziert eine Steigerung der Temperatur auf 37 °C die Bildung von Hyphen. Weiterhin kann die Ausbildung von Hyphen durch Seren, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), einen neutralen pH-Wert, Sauerstofflimitierungen sowie Hungerbedingungen („Spider“- oder „Lee’s“-Medium) induziert bzw. verstärkt werden (Cassone *et al.*, 1985; Buffo *et al.*, 1984; Ernst, 2000).

Eine weitere Wachstumsform von *C. albicans* sind die runden, dickwandigen Chlamydosporen. Sie werden von Suspensorzellen an Pseudohyphen produziert und sind etwa drei- bis viermal so groß wie Hefezellen. Da die Ausbildung dieser Zellform bei Nährstoffmangel beobachtet wird, wird vermutet, dass es sich um eine Überdauerungsform handelt (Staib und Morschhäuser, 2005).

Etwa 10 % aller *C. albicans*-Stämme, die homozygot für den *MTL* (mating type like)-Locus sind, besitzen weiterhin die Fähigkeit spontan zwischen dem *white*- und dem *opaque*-Phänotypen zu wechseln („phenotypic switching“) (Lockhart *et al.*, 2002). Normalerweise bildet *C. albicans* weiße, halbkugelförmige Kolonien aus, die typische Hefezellen enthalten (*white*-Phänotyp). Kolonien der *opaque*-Form sind hingegen grau und flach und bestehen aus stabförmigen Zellen (Slutsky *et al.*, 1985). Begleitet wird der Phänotypenwechsel durch

eine veränderte Expression von Genen, die für den Metabolismus, die Adhäsion, die Stressantwort aber auch die Virulenz von Bedeutung sind (Lan *et al.*, 2002). Beide Zellformen haben möglicherweise unterschiedliche Funktionen bei der Infektion, da *white*-Zellen hauptsächlich die Verbreitung im Blutkreislauf begünstigen, während *opaque*-Zellen besser für die Kolonisation an Zelloberflächen geeignet sind (Kvaal *et al.*, 1997; Kvaal *et al.*, 1999; Lachke *et al.*, 2003).

1.2.3 Hypoxische Anpassung

Hypoxie ist definiert als die reduzierte Verfügbarkeit von Sauerstoff. Ausgangspunkt hierfür ist die Sauerstoffkonzentration in unserer Luft, die als normoxisch bezeichnet wird und ca. 21 % beträgt. Eine vollständige Abwesenheit von Sauerstoff wird hingegen als anoxisch bezeichnet. Die Konzentration von Sauerstoff innerhalb des menschlichen Körpers liegt immer unterhalb des atmosphärischen Levels. Selbst in den Alveolen der Lunge beträgt die Sauerstoffkonzentration nur etwa 14 %. Erreicht Sauerstoff die Organe über die Kapillaren, beträgt die Konzentration des Moleküls oft nur 2-4 % (West, 1985; Warn *et al.*, 2004). Stark hypoxische Bereiche ($< 1\% \text{ O}_2$) werden ebenfalls in Wunden und nekrotischem Geweben beschrieben (Nizet und Johnson, 2009). Es ist bekannt, dass Pilzinfektionen zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Sauerstoffkonzentration führen. In entzündeten Geweben kann der Pathogen zusammen mit den Immunzellen die Blutgefäße regelrecht verstopfen, was zu einer gestörten Blut- bzw. Sauerstoffversorgung führen kann (Grahl und Cramer, 2010).

Da *C. albicans* verschiedene Bereiche des menschlichen Körpers besiedeln kann, muss sich der Pilz an diese unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen anpassen. Bisher gibt es nur wenige Informationen über den Einfluss von Hypoxie auf *C. albicans*. *In vitro* wurde festgestellt, dass der Pilz unter hypoxischen Bedingungen verschiedene Phänotypen aufweist und, dass sich das Genexpressionsmuster ändert (Setiadi *et al.*, 2006). Wachsen Zellen des Pilzes auf festem Medium und sind gleichzeitig von einem Deckglas bedeckt, kommt es zur Bildung von Chlamydosporen. Es wird vermutet, dass dies durch den Oberflächenkontakt in der sauerstoffarmen Umgebung verursacht wird (Sonneborn *et al.*, 1999). Ein Wachstum von *C. albicans* in Agar oder unter hypoxischen Bedingungen auf Agar fördert außerdem die Hyphenbildung in Medium, das unter normoxischen Bedingungen nicht zu einer Filamentierung führt (Sonneborn *et al.*, 1999; Setiadi *et al.*, 2006). Hypoxische Bedingungen

beeinflussen auch den *white-opaque*-Phänotypenwechsel. Die *opaque*-Form ist unter normoxischen Bedingungen und 37 °C instabil; hypoxische Bedingungen stabilisieren diese Zellform jedoch auch bei 37 °C (Dumitru *et al.*, 2007). Dagegen konnten Huang *et al.* (2009) zeigen, dass der Phänotypenwechsel eher durch eine hohe CO₂-Konzentration, als durch Hypoxie ausgelöst wird.

Neben dem Einfluss auf morphologische Phänotypen beeinflusst das Wachstum unter hypoxischen Bedingungen die Genexpression und das Transkriptom. Es konnte gezeigt werden, dass Transkripte von Genen des fermentativen Metabolismus, einschließlich glykolytischer Gene sowie von einigen hyphenspezifischen Genen erhöht wurden, während Transkriptspiegel der Gene des oxidativen Metabolismus (Atmungskette, ATP-Synthese, Zitronensäurezyklus) erniedrigt wurden (Setiadi *et al.*, 2006). Dieses Regulationsmuster ist in ähnlicher Form in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* sowie in Säugerzellen zu finden und unterscheidet sich von dem in *S. cerevisiae* (Setiadi *et al.*, 2006). Der „Crabtree-Effekt“ bei *S. cerevisiae* begünstigt bei hohen Glukosekonzentrationen den fermentativen Metabolismus auch unter aeroben Bedingungen (Gancedo, 1992; ter Linde *et al.*, 1999).

Die molekularen Mechanismen der hypoxischen Anpassung in *C. albicans* sind weitestgehend unbekannt. Der Transkriptionsfaktor Efg1 (enhanced filamentous growth factor 1) spielt eine Rolle in allen morphologischen Formen von *C. albicans*. Er scheint auch in der hypoxischen Anpassung eine Schlüsselrolle zu spielen, da er an der Regulation von bis zu 50 % der hypoxisch regulierten Gene beteiligt ist (Ernst und Tielker, 2009).

Neben der Sauerstoff- ist die Kohlenstoffdioxid-Konzentration ein wichtiger Parameter für die Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt. Im menschlichen Körper können CO₂-Konzentrationen von 5-6 % auftreten, während der CO₂-Gehalt der Luft lediglich bei 0,033 % liegt (Guyton und Hall, 2000; Monnin *et al.*, 2001). In vielen Studien werden daher Experimente unter Normoxie und erhöhten CO₂-Konzentrationen (ca. 5 %) durchgeführt. Da niedrige O₂- oft mit hohen CO₂-Konzentrationen assoziiert sind (z.B. in Geweben), sollten Untersuchungen unterschiedliche O₂- und CO₂-Konzentrationen einschließen. Da *C. albicans* als Humanpathogen verschiedene Nischen besiedelt, wird der Pilz auch mit unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen konfrontiert. Es ist bereits bekannt, dass in *C. albicans* hohe CO₂-Konzentrationen die Hyphenbildung und den Wechsel zwischen der *white*- und *opaque*-Form stimulieren (Klengel *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009).

1.2.4 Regulation der Hyphenbildung bei Normoxie

Wegen der hohen phylogenetischen Verwandtschaft wird *S. cerevisiae* als Modellorganismus verwendet, um zelluläre Prozesse von *C. albicans* zu untersuchen. Durch homologe Proteine war es möglich, konservierte Signalwege zu identifizieren, die die Hyphenbildung in *C. albicans* kontrollieren (Gimeno *et al.*, 1992). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass *S. cerevisiae* keine echten Hyphen, sondern lediglich Pseudohyphen ausbildet. Die Bildung von Hyphen in *C. albicans* wird über mehrere Signalwege gesteuert, wobei die MAPK (mitogen activated protein kinase)-Kaskade sowie der cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA)-Weg am besten untersucht sind (Abb. 1.3). Die Zielproteine der Signalwege sind die Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1. Eine *cph1 efg1* - Doppelmutante ist afilamentös und avirulent, weshalb angenommen wird, dass diese beiden Signalwege parallel verlaufen und gemeinsam die Regulation der Hyphenbildung kontrollieren, wobei der PKA-Weg von größter Bedeutung ist (Lo *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 2000). Beide Signalwege werden durch das G-Protein Ras1 aktiviert (Feng *et al.*, 1999). Unter normoxischen Bedingungen wird die Ausbildung von Hyphen durch äußere Einflüsse ausgelöst. Dazu zählen Temperaturen von 37 °C, ein neutraler pH-Wert sowie die Anwesenheit von N-Acetylglucosamin (Buffo *et al.*, 1984; Cassone *et al.*, 1985). Ein weiterer positiver Auslöser der Hyphenbildung ist Serum, wobei hauptsächlich das im Serum vorhandene Muramyldipeptid (MDP) die Hyphenbildung stimuliert. MDP ist eine Komponente der bakteriellen Zellwand (Peptidoglycan), die in Seren von Säugern vorkommt (Xu *et al.*, 2008). Nach Aktivierung von Ras1 erfolgt im Falle der MAPK-Kaskade die Signalweiterleitung über die GTPase Cdc42, welche wiederum die Kinase Cst20 aktiviert. Dies führt zur Aktivierung des MAP-Kinase-Moduls, das aus den drei Kinasen Ste11, Hst7 und Cek1 besteht, wobei Cek1 die zentrale Komponente darstellt. Die Weiterleitung des Signals erfolgt hierbei nacheinander durch Phosphorylierung und resultiert in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Cph1, welcher die Hyphenausbildung anregt (Liu *et al.*, 1994; Csank *et al.*, 1998). Neben der MAPK-Kaskade muss ein weiterer Signalweg für die Ausbildung der Hyphen verantwortlich sein, da Mutationen der einzelnen Komponenten nur unter bestimmten Bedingungen zu Defekten in der Filamentierung führen. Eine Deletion von Komponenten des PKA-Signalweges führt meist zu einem vollständigen Defekt der Filamentierung (Feng *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2001). Dadurch stellt der PKA-Weg den wichtigsten Signalweg in der Regulation des Dimorphismus dar.

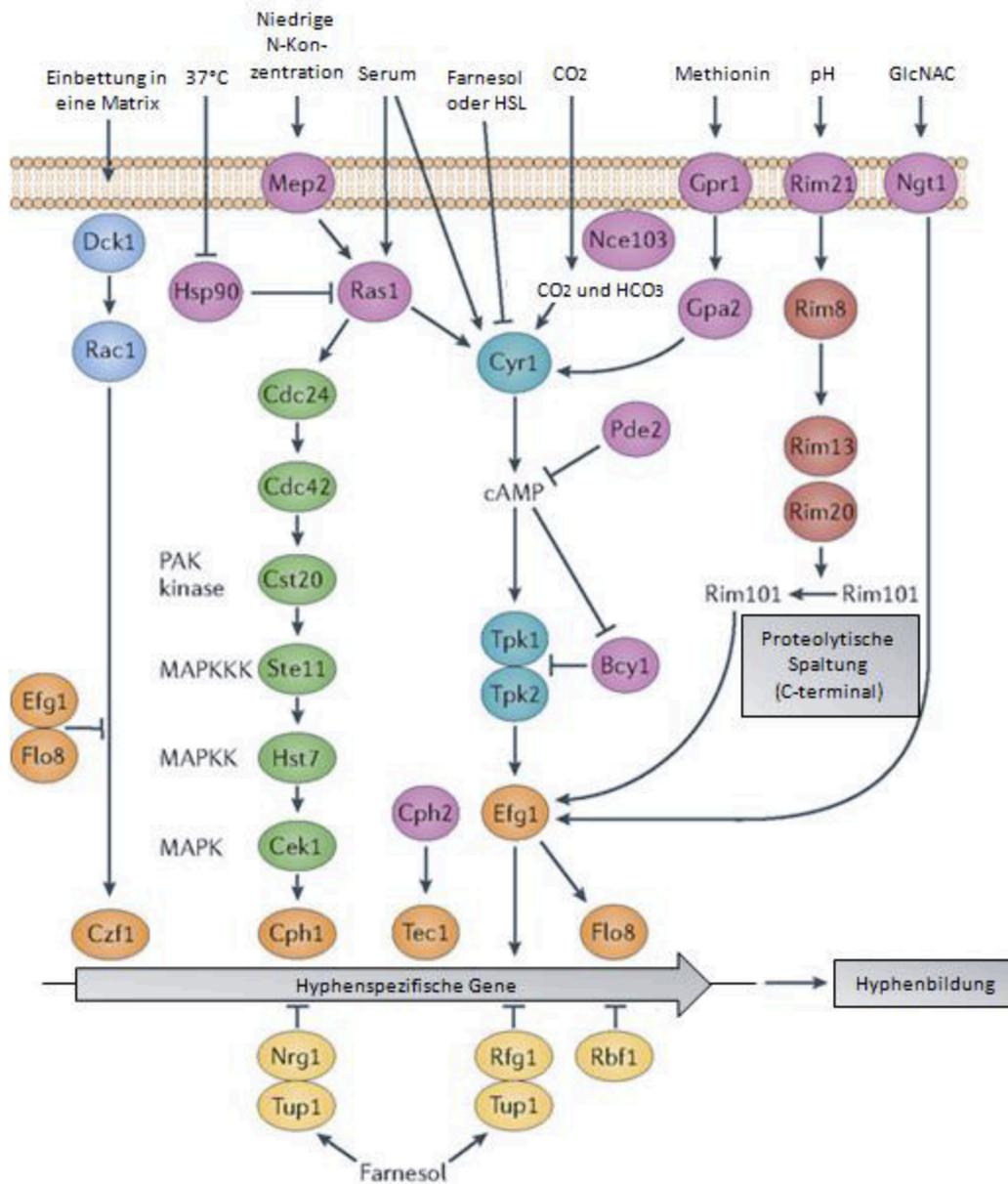


Abb. 1.3: Regulation der Hyphenbildung in *C. albicans* unter normoxischen Bedingungen (Sudbery *et al.*, 2011; modifiziert). Gezeigt sind die Signalwege, die die Hyphenbildung in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen regulieren. Die MAPK-Kaskade (grün) sowie der PKA/cAMP-abhängige Signalweg (blau) sind am besten untersucht. Letzterer reguliert den zentralen Transkriptionsfaktor Efg1 und hat daher bei der Ausbildung von Hyphen die wichtigste Rolle inne. Transkriptionsfaktoren sind orange dargestellt, negative Regulatoren der Hyphenbildung gelb. HSL = Homoserinlacton, GlcNAC = N-Acetylglucosamin.

Die PKA gehört zu der Familie der AGC-Kinasen und besteht aus einer inhibierenden regulatorischen (Bcy1) und einer katalytischen Untereinheit. Jeweils 2 Bcy1-Proteine bilden zusammen mit zwei Proteinen der katalytischen Untereinheit die heterotetramere PKA. Dabei stellen die Isoformen der katalytischen Untereinheit (Tpk1 und Tpk2) die zentralen Komponenten des PKA-Signalweges dar. Bei Anwesenheit des „second messengers“ cAMP bindet das Molekül an Bcy1, wodurch die regulatorische Untereinheit vom Proteinkomplex

dissoziiert. Dadurch werden die katalytischen Untereinheiten aktiviert und freigesetzt (Cassola *et al.*, 2004). cAMP entsteht aufgrund äußerer Signale durch die Adenylatcyclase Cyr1, welche cAMP aus ATP synthetisiert. Eine Regulation der cAMP-Konzentration erfolgt weiterhin durch die Phosphodiesterase Pde2, welche die Hydrolyse von cAMP veranlasst (Jung und Stateva, 2003). Durch hohe CO₂-Konzentrationen kann der PKA-Weg unabhängig von Ras1 aktiviert werden. *C. albicans* wandelt mit Hilfe der Carboanhydrase Nce103 CO₂ zusammen mit H₂O zu HCO₃⁻ und H⁺ um. Das entstandene Hydrogencarbonat ist anschließend in der Lage, Cyr1 zu aktivieren (Klengel *et al.*, 2005). Der Sesquiterpenalkohol Farnesol, der von *C. albicans* bei hoher Zelldichte als „Quorum Sensing“-Molekül produziert wird, hemmt dagegen Cyr1 durch direkte Bindung (Davis-Hanna *et al.*, 2008).

Die Rolle der katalytischen PKA-Isoformen in Bezug auf die Hyphenbildung ist abhängig vom Wachstumsmedium. Während Tpk1 eher für die Filamentierung auf einigen festen Medien benötigt wird, fördert Tpk2 bevorzugt die Hyphenbildung in flüssigem Medium (Bockmühl *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass die PKA den zentralen Transkriptionsfaktor Efg1 direkt durch Phosphorylierung aktiviert. Ein *efg1*-Deletionsstamm ist nicht in der Lage Hyphen auszubilden. Hinweise darauf, dass Efg1 ein Zielprotein der PKA ist, konnten durch den Austausch einer potentiellen PKA-Phosphorylierungsstelle (Threonin 206) erlangt werden. Eine Substitution von Threonin 206 durch Alanin führt zu einem afilamentösen Phänotypen, während Glutamat (als Phosphat-Analog) die Hyphenbildung erlaubte (Bockmühl und Ernst, 2001). Weiterhin ist bekannt, dass es bei Hypheninduktion zu einer Herabregulation des *EFG1*-Transkriptspiegels kommt (Tebarth *et al.*, 2003). Lassak *et al.* (2011) konnten zeigen, dass für eine zügige Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität Efg1 sowie die PKA-Isoform Tpk2 benötigt werden.

Als Interaktionspartner von Efg1 konnten die Transkriptionsfaktoren Flo8 und Czf1 identifiziert werden (Noffz *et al.*, 2008). Dabei wird angenommen, dass Flo8 zusammen mit Efg1 die Hyphenbildung reguliert, da die beiden Proteine teilweise ähnliche Gene regulieren und ein *flo8*-Deletionsstamm nicht in der Lage ist Hyphen auszubilden (Noffz *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2006). Für das Zinkfingerprotein Czf1 ist bekannt, dass es für die Hyphenbildung unter speziellen Bedingungen benötigt wird und ein Gegenspieler von Efg1 ist (Brown *et al.*, 1999; Giusani *et al.*, 2002).

1.2.5 Regulation der Hyphenbildung bei Hypoxie

Die Regulationsmechanismen der Morphogenese von *C. albicans* unter Hypoxie sind nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Efg1 eine Schlüsselrolle in der Anpassung an hypoxische Bedingungen einnimmt und auch die Hyphenbildung bei Hypoxie reguliert. Während er unter normoxischen Bedingungen das Hyphenwachstum aktiviert, ist Efg1 unter hypoxischen Bedingungen ein Repressor der Hyphenbildung (Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006). Ein *efg1*-Deletionsstamm zeigt daher unter Normoxie eine defekte Hyphenbildung, während er unter Hypoxie und Temperaturen von 25 - 35 °C ein hyperfilamentöses Wachstum aufweist. Bei Temperaturen von 37 °C kann diese Mutante jedoch keine Hyphen bilden, so dass Efg1 bei dieser Temperatur auch bei Hypoxie ein Aktivator der Hyphenbildung ist. Deletionen der PKA-Isoformen Tpk1 oder Tpk2 führten unter Hypoxie zu keiner Veränderung des Phänotyps im Vergleich zum Wildtypstamm (Setiadi, 2006), weshalb angenommen wurde, dass die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen durch einen alternativen Signalweg reguliert wird, welcher von Efg1 reprimiert wird. Da eine Einbettung in Agar mit der Limitierung von Sauerstoff einhergeht, kann angenommen werden, dass die Transkriptionsfaktoren Czf1 und Flo8 weitere Komponenten dieses Signalweges sein könnten. Während Czf1 für die Hyphenbildung bei Agar-Einbettung benötigt wird, konnte für Flo8 gezeigt werden, dass das Protein unter diesen Bedingungen wie Efg1 als Repressor der Hyphenbildung agiert (Giusani *et al.* 2002; Cao *et al.*, 2006). Weiterhin zeigten Du *et al.* (2012), dass Flo8 ein Regulator der CO₂-abhängigen Morphogenese ist. Sie stellten außerdem die These auf, dass Flo8 in einem noch unbekanntem Signalweg agiert, der parallel zum PKA-Weg verläuft. Dabei sind beide Signalwege CO₂-abhängig und konvergieren in Flo8 (Du *et al.*, 2012).

Mit der Proteinkinase B Sch9 konnte eine AGC-Kinase identifiziert werden, die die hypoxische Anpassung reguliert. Stichernoeth (2009) untersuchte einen *sch9*-Deletionsstamm unter verschiedenen Kombinationen von O₂- und CO₂-Konzentrationen, wobei auch die Temperatur variiert wurde. Sie konnte zeigen, dass Sch9 unter hypoxischen Bedingungen (O₂-Konzentrationen < 10 %), erhöhten CO₂-Konzentrationen (> 1 %) und Temperaturen unter 37 °C ein Repressor der Hyphenbildung ist. Unter diesen Bedingungen zeigte eine *sch9*-Mutante einen hyperfilamentösen Phänotypen. Die Reprimierung der Hyphenbildung durch Sch9 ist also im Gegensatz zu der Efg1-vermittelten Reprimierung CO₂-abhängig. Die Proteinkinase B Sch9 gehört, wie die PKA-Isoformen, zu den AGC-Kinasen und

wurde als das homologe Protein zu Sch9 von *S. cerevisiae* charakterisiert (Liu *et al.*, 2010). Bei *C. albicans* gibt es bislang nur wenige Kenntnisse über die Funktion und Regulation dieses Proteins. In *S. cerevisiae* ist Sch9 Teil des TOR (target of rapamycin)-Signalweges (Abb. 1.4), der in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot das Zellwachstum, die Langlebigkeit und die Stressantwort reguliert (Cardenas *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2002; Fabrizio *et al.*, 2001).

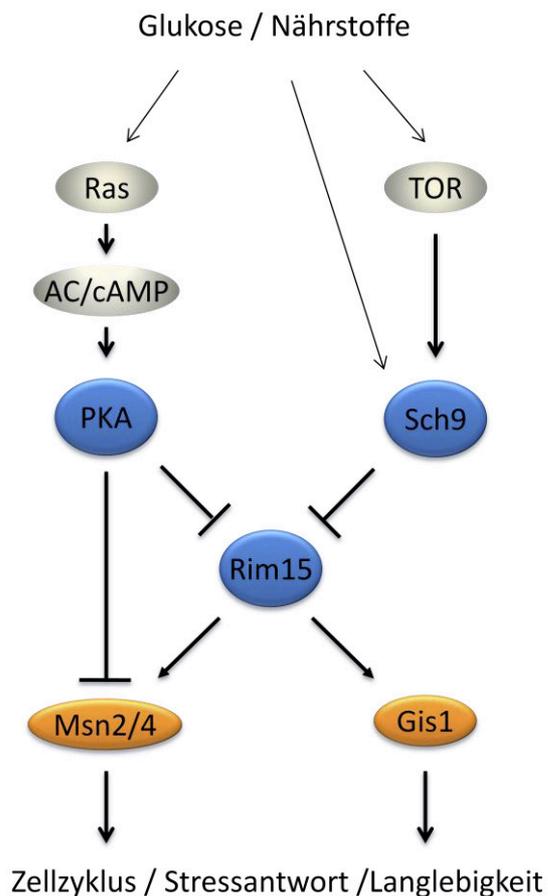


Abb. 1.4: TOR-Signalweg in *S. cerevisiae*. Regulation des Zellzyklus, der Stressantwort und Langlebigkeit in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot. Der PKA- und der TOR-Signalweg verlaufen parallel und regulieren beide die AGC-Kinase Rim15. AC = Adenylatcyclase. AGC-Kinasen sind blau, Transkriptionsfaktoren orange dargestellt.

TOR ist eine hochkonservierte Serin/Threoninkinase, die durch das makrozyklische Lacton Rapamycin gehemmt werden kann (de Virgilio und Loewith, 2006). Rapamycin gelangt durch Diffusion in die Zelle und bindet an die Peptidyl-Prolyl-Isomerase FKBP12, was zur Entstehung eines toxischen Komplexes führt. Angrenzend an die Kinasedomäne besitzt die TOR-Kinase eine

FRB (FKBP12-rapamycin-binding)-Domäne. Dort kann der FKBP12-Rapamycin-Komplex binden, was zu einer Hemmung von TOR führt (Cruz *et al.*, 2001). Diese Inhibierung von TOR kann ebenfalls durch den Einsatz von Koffein erreicht werden (Wanke *et al.*, 2008). Bei *S. cerevisiae* wurden zwei TOR-Proteine charakterisiert, die in Komplexen angeordnet sind (TORC1 und TORC2). Im Gegensatz dazu besitzt *C. albicans* lediglich ein TOR-Homolog (Tor1) (Cruz *et al.*, 2001). Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass TOR die AGC-Kinase Sch9 durch Phosphorylierung aktiviert und Sch9 im Gegenzug Rim15 (eine weitere AGC-Kinase) inhibiert (Abb. 1.4). Es wird angenommen, dass Sch9 und die PKA in parallelen Signalwegen agieren, wobei die Signalwege in der AGC-Kinase Rim15 konvergieren (Zurita-Martinez und Cardenas, 2005; Roosen *et al.*, 2005; Pedruzzi *et al.*, 2003). Bei Nährstoffmangel oder Inhibierung von

TOR durch Rapamycin wird Rim15 nicht mehr durch Sch9 inhibiert und aktiviert die Transkriptionsfaktoren Msn2/4 sowie Gis1. Dies führt zur Aktivierung von Genen, die die Stressantwort aber auch den Eintritt in die G₀-Phase und die Langlebigkeit kontrollieren (Wanke *et al.*, 2008).

Über die Funktionen und die Regulation der AGC-Kinasen Sch9 und Rim15 bei *C. albicans* ist bisher wenig bekannt. Eine Korrelation der Funktionen von Sch9 aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* konnte Stichternoth (2009) beobachten. So führt eine Deletion von *SCH9* zu kleineren Kolonien, was für eine *sch9*-Mutante von *S. cerevisiae* bereits beschrieben wurde (Jorgensen *et al.*, 2002). Über den TOR-Signalweg beeinflusst das Nährstoffangebot die Zellgröße, so dass Zellen und Kolonien von *S. cerevisiae* in nährstoffreichem Medium größer, als in einem nährstoffarmen Medium sind (Jorgensen *et al.*, 2002). Dabei stellte sich heraus, dass in *S. cerevisiae* Sch9 als Regulator der Ribosomenbiogenese maßgeblich das Zellwachstum beeinflusst (Jorgensen *et al.*, 2004). Huber *et al.* (2011) vermuten, dass die Regulation über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Stb3, Dot6 und Tod6 führt, was wiederum die Aktivierung der Histon-Deacetylase Rpd3 verhindert. Dadurch wird die Rekrutierung von Rpd3 an Gene, die Einfluss auf die Ribosomenbiogenese haben, verhindert. Für die AGC-Kinase Rim15 stellte Setiadi (2002) fest, dass das Protein in *C. albicans* unter normoxischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Morphogenese ausübt. Es wurde außerdem vermutet, dass Rim15 im Gegensatz zu Sch9 nicht Teil des alternativen Signalweges unter hypoxischen Bedingungen ist (Stichternoth, 2009).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Proteinkinasen A, G und C sind die Namensgeber der Familie der AGC-Kinasen. Die Mitglieder dieser Familie regulieren ein großes Spektrum zellulärer Funktionen, wie z.B. das Zellwachstum, die Proliferation und die Stressresistenz. Dadurch haben sie großen Einfluss auf die Virulenz des humanpathogenen Pilzes *C. albicans*. Als wichtigste Virulenzeigenschaft gilt dabei der Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenform (Dimorphismus). Die Regulation des Dimorphismus ist unter normoxischen Bedingungen gut untersucht und wird hauptsächlich über den Proteinkinase A (PKA)-Signalweg reguliert, dessen Hauptbestandteile die PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 sind. Unter hypoxischen Bedingungen reguliert die Proteinkinase B Sch9 einen alternativen Signalweg, der zur Inhibierung der Hyphenbildung führt.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, die intrazelluläre Lokalisation der drei AGC-Kinasen Tpk1, Tpk2 und Sch9 zu klären. Da aus *S. cerevisiae* bereits bekannt war, dass PKA-Isoformen mit ihren Zielgenen assoziiert sind (Pokholok *et al.*, 2006), wurde ebenfalls die chromosomale Assoziation der Kinasen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der hypoxische Signalweg von Sch9 genauer untersucht werden. Ziel war es, Hinweise auf die Existenz einer Tor1-Sch9-Rim15-Kaskade in *C. albicans* zu erhalten. Zusätzlich sollte nach neuen Interaktionspartnern von Sch9 gesucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien, Gase und Enzyme

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Agilent Technologies (Böblingen), Ambion (Kassel), Amersham (Braunschweig), Bio-Budget (Krefeld), Biorad (München), B. Braun (Melsungen), Calbiochem (Bad Soden), Difco (Detroit, USA), Fluka (Buchs, CH), Gibco BRL (Eggenstein), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Pierce (Rockford, USA), Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene (Amsterdam, NL), Whatman (Maidstone, GB), Zymo Research (Freiburg). Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.

Genutzte Gase stammen von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf).

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α F'	F' [Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15] Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> <i>r_K⁻ m_K⁺ supE44 thi-1 gyrA relA</i>	Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989
Top10F'	F' [<i>lacI^f</i> , Tn10(Tet ^R)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>endA1 recA1</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>deoR nupG araD139 galU</i> Δ <i>lacX74 galk</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) Δ (<i>ara-leu</i>)7697	Invitrogen

2.2.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ</i> <i>LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
W303-1A	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2</i>	Pascual-Ahuir und Proft, 2007
MAP85	wie W303-1A, aber <i>SCH9-3HA::loxP-KAN-loxP</i>	Pascual-Ahuir und Proft, 2007

2.2.3 *C. albicans*-Stämme

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	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
RM1000	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG</i>	Negredo <i>et al.</i> , 1997
BWP17	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1999
SN250	<i>ura3::imm434::URA3-IRO1/ura3::imm434 arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG leu2::hisG::HIS1/leu2::hisG::LEU2</i>	Noble <i>et al.</i> , 2010
MK106	wie SC5314, aber <i>ace2::FRT/ace2::FRT</i>	Kelly <i>et al.</i> , 2004
II	wie CAI4, aber <i>TPK1/tpk1::hisG-URA3-hisG</i>	Bockmühl <i>et al.</i> , 2001
FII4a	wie CAI4, aber <i>TPK1/tpk1::hisG</i>	Bockmühl <i>et al.</i> , 2001
IIHB6	wie CAI4, aber <i>tpk1::hisG-URA3-hisG/tpk1::hisG</i>	Bockmühl <i>et al.</i> , 2001
HPY300U (tpk1mut)	wie CAI4, aber <i>tpk1::hisG/tpk1::hisG URA3/ura3::imm434</i>	Park <i>et al.</i> , 2005
TPK7	wie CAI4, aber <i>TPK2/tpk2::hisG-URA3-hisG</i>	Sonneborn <i>et al.</i> , 2000
TPO7.4	wie CAI4, aber <i>tpk2::hisG/tpk2::hisG-URA3-hisG</i>	Sonneborn <i>et al.</i> , 2000
AS1	wie CAI4, aber <i>tpk2::hisG/tpk2::hisG</i>	Sonneborn <i>et al.</i> , 2000
HPY400U (tpk2mut)	wie CAI4, aber <i>tpk2::hisG/tpk2::hisG URA3/ura3::imm434</i>	Park <i>et al.</i> , 2005
CAS1	wie CAI4, aber <i>SCH9/sch9::hisG-URA3-hisG</i>	L. Giasson
CAS2	wie CAI4, aber <i>SCH9/sch9::hisG</i>	Setiadi, Dissertation 2006
CAS4	wie CAI4, aber <i>sch9::hisG/sch9::hisG</i>	Setiadi, Dissertation 2006
CAR 23-7-5-1	wie CAI4, aber <i>rim15::hisG/rim15::hisG</i>	Setiadi, Dissertation 2006
CCS3	wie CAS4, aber <i>URA3</i> am nat. Genort rekonstituiert	Stichternoth, Dissertation 2009
CCS4	wie CAS4, aber <i>leu2::ACT1p-SCH9 URA3</i>	Stichternoth, Dissertation 2009
CCS5	wie CAS4, aber <i>leu2::URA3</i>	Stichternoth, Dissertation 2009
CCS6	wie CAR23-7-5-1, aber <i>URA3</i> am nat. Genort rekonstituiert	Stichternoth, Dissertation 2009
LG082	wie CAI4, aber <i>tpk2::cat/tpk2::cat bcy1/bcy1</i>	Cassola <i>et al.</i> , 2004
Can52	wie CAI4, aber <i>ras1::hisG/ras1::hph</i>	Feng <i>et al.</i> , 1999

CR216	wie CAI4, aber <i>cyr1::hisG-URA3-hisG/cyr1::hisG</i>	Rocha <i>et al.</i> , 2001
MMC3	wie CAI4, aber <i>nrg1::hisG-URA3-hisG/nrg1::hisG</i>	Murad <i>et al.</i> , 2001a
JLC19	wie CAI4, aber <i>cph1::hisG/cph1::hisG-URA3-hisG</i>	Liu <i>et al.</i> , 1994
CKY230	wie CAI4, aber <i>czf1::hisG/czf1</i>	Brown <i>et al.</i> , 1999
CCF3	wie CAI4, aber <i>flo8::hisG/flo8::hisG-URA3-hisG</i>	Cao <i>et al.</i> , 2006
SFC3	wie CAI4, aber <i>sin3::hisG/sin3::hisG-URA3-hisG</i>	A. Dominguez
BCa2-10	wie CAI4, aber <i>tup1::hisG/tup1::hisG::p403-URA3</i>	Braun und Johnson, 1997
TCC103	wie CAI4, aber <i>arg4::hisG200/arg4::hisG200 tcc1::hph200/tcc1::ARG4</i>	Kaneko <i>et al.</i> , 2006
NDH3	wie CAI4, aber <i>hda1::hisG/hda1::hisG-URA3-hisG</i>	A. Dominguez
CNC13	wie RM1000, aber <i>hog1::hisG-URA3-hisG/hog1::hisG</i>	San José <i>et al.</i> , 1996
CJN702	wie BWP17, aber <i>his1::hisG::pHIS1/his1::hisG bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	Nobile <i>et al.</i> , 2006
CJN698	wie BWP17, aber <i>his1::hisG::pHIS1-BCR1/his1::hisG bcr1::ARG4/bcr1::URA3</i>	Nobile <i>et al.</i> , 2006
jjh31	wie BWP17, aber <i>pbs2::Tn7-UAU1/pbs2::URA3</i>	Blankenship <i>et al.</i> , 2010
HZY2-1	wie BWP17, aber <i>sco1::ARG4/sco1::HIS1</i>	Vandeputte <i>et al.</i> , 2012
HLY4100	wie BWP17, aber <i>ptp2::HIS1/ptp2::ARG4</i>	Su <i>et al.</i> , 2013
ptp3-deletant	<i>ura3::imm434::URA3-IRO1/ura3::imm434 arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG/his1::hisG leu2::hisG/leu2::hisG ptp3::LEU2/ptp3::HIS1</i>	Noble <i>et al.</i> , 2010
HLY4101	wie ptp3-deletant, aber <i>ptp2::URA3/ptp2::ARG4</i>	Su <i>et al.</i> , 2013
TF022	wie SN250, aber <i>brg1::LEU2/brg1::HIS1</i>	Homann <i>et al.</i> , 2009
AF1001 /TPO7	wie CAI4, aber <i>TPK2/tpk2::hisG</i>	diese Arbeit
AF1002	wie CAI4, aber <i>rim15::hisG/rim15::hisG sch9::hisG/sch9::hisG-URA3-hisG</i>	diese Arbeit
AF1003	wie CAI4, aber <i>TPK1^{HA}::URA3/TPK1</i>	diese Arbeit
AF1004	wie CAI4, aber <i>TPK1^{HA}::URA3/tpk1::hisG</i>	diese Arbeit
AF1005	wie CAI4, aber <i>TPK2^{HA}::URA3/tpk2::hisG</i>	diese Arbeit
AF1006	wie CAI4, aber <i>SCH9^{HA}::URA3/sch9::hisG</i>	diese Arbeit
AF1007	wie CAI4, aber <i>BCY1^{HA}::URA3/BCY1</i>	diese Arbeit

2.2.4 Medien zur Anzucht von *E. coli*

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

Zur Herstellung fester Medien wurde 2 % Agar zugesetzt. Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37 °C.

2.2.5 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium): 2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2 % Glukose
YPS 2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2 % Saccharose
SD (Minimalmedium): 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose, pH 6,8 mit NaOH eingestellt

Glukose und Saccharose wurden jeweils als 40 %ige Lösungen getrennt autoklaviert. Zur Herstellung fester Medien wurden 2 % Agar zugegeben. Bei Bedarf wurde das Minimalmedium mit Aminosäuren nach Zimmermann (1975) versetzt. Dazu wurde ein 50-facher Aminosäure-Mix hergestellt und 50 ml pro 1 l Medium zugesetzt. Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30 °C.

50x Aminosäure-Mix (Zimmermann, 1975; modifiziert):

Adenin 0,28 g/l	Phenylalanin 0,06 g/l
Arginin 0,48 g/l	Threonin 0,0375 g/l
Histidin 0,024 g/l	Tryptophan 0,024 g/l
Isoleucin 0,072 g/l	Tyrosin 0,0375 g/l
Leucin 0,042 g/l	Uracil 0,024 g/l
Lysin 0,0375 g/l	Valin 0,0375 g/l
Methionin 0,024 g/l	

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

Um Uridin-auxotrophe *C. albicans*-Stämme zu generieren wurden 5 ml einer *C. albicans*-Übernachtskultur mit 5-FOA-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 verdünnt und 10 bzw. 50 µl dieser Verdünnung auf FOA-Platten ausgestrichen. Gewachsene Kolonien wurden auf 5-FOA-Platten vereinzelt und zur Kontrolle ebenfalls auf SD-Platten ausgestrichen.

5-FOA-Medium: 0,17 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat), 2 % Glukose, 0,1 % Prolin, 0,001 % Uridin, 0,02 % FOA (McCusker und Davis, 1991)

2.2.7 Medien zur Hypheninduktion von *C. albicans*

Für die Hypheninduktion von *C. albicans* auf festem Medium wurden Spider-Platten (Liu *et al.*, 1994) verwendet:

Spider-Platten: 1 % Nutrient Broth (Oxoid), 1 % Mannitol, 0,2 % K₂HPO₄,
100 mM NaCl, 2 % Agar

Zur Hypheninduktion in flüssigem Medium wurde YP-Medium mit 10 % Pferdeserum (Sigma) verwendet. 5 ml *C. albicans*-Übernachtkultur wurden mit ddH₂O gewaschen und in 5 ml YP-Medium resuspendiert. Für die Hauptkultur wurde YP-Medium bei 37 °C vorgewärmt, auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert und mit 10 % (v/v) Pferdeserum versetzt. Das Wachstum der Hefen erfolgte bei 37 °C. Die Zellernte erfolgte in der Regel nach 30 min.

2.3 Anzucht von *C. albicans*-Stämmen

2.3.1 Inkubation von *C. albicans* unter normoxischen Bedingungen

Die Anzucht von *C. albicans*-Stämmen erfolgte je nach Bedarf bei 25 °C, 30 °C oder 37 °C.

2.3.2 Inkubation von *C. albicans* unter hypoxischen Bedingungen

Für die Inkubation von *C. albicans*-Stämmen unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Hypoxiebank (Invivo200, Ruskinn) verwendet. Mit Hilfe von Stickstoff, Kohlenstoffdioxid und Druckluft konnte eine definierte Atmosphäre erzeugt werden.

Bei Nutzung von festen Medien wurden die Stämme zunächst auf YPS-Platten vereinzelt und für 3 bis 4 Tage bei den jeweiligen Gas- und Temperaturbedingungen inkubiert. Flüssiges Medium wurde vor der Inokulation über Nacht in der Hypoxiebank voräquilibriert.

2.4 Plasmide und Primer

2.4.1 Plasmide

Tab 2.4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGBD-C1	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> , Two-Hybrid-Vektor, Sequenz der Gal4-Bindedomäne vor einer MCS, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und Terminator	James <i>et al.</i> , 1996
pGAD-C1	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> , Two-Hybrid-Vektor, Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne vor einer MCS, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator	James <i>et al.</i> , 1996
pCL2	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> , Two-Hybrid-Vektor, <i>GAL4</i> vor einer MCS, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #1507

pDYC-C1	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> , Genomische Two-Hybrid-, Genbank“ aus dem <i>C. albicans</i> -Stamm CAI4. Genomische DNA mit <i>TaqI</i> , <i>Maell</i> , <i>Hinfl</i> , <i>Acil</i> und <i>MspI</i> in Fragmente zwischen 0,5 und 3 kb geschnitten und an die Sequenz der Aktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pDYC-C2	wie pDYC-C1, aber mit einem Frameshift von einer Base	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pDYC-C3	wie pDYC-C1, aber mit einem Frameshift von zwei Basen	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pWP9	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> , Two-Hybrid-Vektor, kodierende Region von <i>CaSCH9</i> an die Sequenz der Bindedomäne von Gal4 fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator	W. Pankov-Bier, unveröffentlicht
p5921-SCH9dis	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i> , <i>SCH9-URA3</i> -Blaster zur Disruption von <i>CaSCH9</i>	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2305
p3HA-URA3	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i> , 3xHA zur C-terminalen Fusion durch PCR	Prill <i>et al.</i> , 2005
pRC2312	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i> , <i>CaLEU2</i> , <i>CaARS</i>	Cannon <i>et al.</i> , 1992
pSM2	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i>	Hall <i>et al.</i> , 2010
pTEF2-CYR1	wie pSM2, aber <i>TEF2p-CYR1</i>	Hall <i>et al.</i> , 2010
pDS1044-1	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i> , <i>CaLEU2</i> , <i>CaARS</i> , <i>ACT1p</i>	D. Sanglard
p2297S9	wie pDS1044-1, aber <i>SCH9</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2315
p2297R1	wie pDS1044-1, aber <i>RIM15</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2312.1
p2297T1	wie pDS1044-1, aber <i>TPK1</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2311
p2297T2	wie pDS1044-1, aber <i>TPK2</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2308
p2297UE	wie pDS1044-1, aber <i>EFG1</i> + UTR mit <i>ACT1p</i> fusioniert	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2306
pPRDACT1CEK1	wie pDS1044-1, aber <i>CEK1</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	P. Desai, unveröffentlicht
pPRDACT1BCR1	wie pDS1044-1, aber <i>BCR1</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	P. Desai, unveröffentlicht
pPRDACT1CAP1	wie pDS1044-1, aber <i>CAP1</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	P. Desai, unveröffentlicht
p2297C	wie pDS1044-1, aber <i>CZF1</i> mit <i>ACT1p</i> fusioniert	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie, #2309

p576	<i>Amp^R, CaURA3, ACT1p-NRG1</i>	Braun <i>et al.</i> , 2001
pLJ19	<i>Amp^R, CaURA3, CaARS, ADH1p-CPH1</i>	Csank <i>et al.</i> , 1998
pQF145.2	<i>Amp^R, CaURA3, MAL2p-RAS1^{V13}</i>	Feng <i>et al.</i> , 1999
pBES119-PTP2	<i>Amp^R, CaURA3, MAL2p-PTP2</i>	H. Liu
pBES119-PTP3	<i>Amp^R, CaURA3, MAL2p-PTP3</i>	H. Liu
pACT1-PBS2-GFP	<i>Amp^R, CaURA3, CaLEU2, CaARS, ACT1p-PBS2-GFP</i>	Arana <i>et al.</i> , 2005
pPCK1p-orf19.895	<i>Amp^R, CaURA3, CaRPS1, PCK1p-HOG1-GTW-TAPtag</i>	Chauvel <i>et al.</i> , 2012

2.4.2 Primer

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete Primer

Name	Sequenz (5' → 3')
Tpk1-HA for	ATTTGATCGATACCCAGAAGATAAAGATTTGGATTATGGTATAAGTGGAGTTGAAGACCC ATATCGTGATCAATTCCAGGACTTTGGTGGTGGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
Tpk1-HA rev	CAATTTAACAAGGAAGCCAATTCATATAGTATCATTGGTTTAAAAACAAGACTGCTTAT ATTTAGCTGTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG-
Tpk2-HA for	GATTCGTCATTGTTTGACCATTATCCAGAAGAACAATTAGACTACGGAAGCCAAGGAGAA GATCCTTATGCTCTGTATTTCTTGACTTTGGTGGTGGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
Tpk2-HA rev	CCGAAAAACAAAGCAGACAAGGAAGAGTCAACATGTTAAGTCATTCGTATAATAACAAA ACGAAAATATTAATGTGCTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
Sch9-HA for	GAAGAAGAAGATGAAATGGAAGTTGATGAAGATCAACATATGGATGATGAATTTGTCAA TGGAAGATTTGATCTTGGTGGTGGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
Sch9-HA rev	GCACAAAATGGAGAAGGAGAAAAAGTAGGAACGGAATTCTATTGAATGGAACAGTTTAG TTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
Bcy1-HA for	TAAATCCGGGTTCCAAAGATTATTGGGTCCTGTTGTGGAGGTATTGAAAGAACAAGACCC TACAAAGAGTCAAGACCCAACTGCTGGTCATGGTGGTGGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
Bcy1-HA rev	CTCGTTCATGCTGCCATCTCGTATATACCTGACAACAAGAAATGTAGTTGAACTTTTGCAC CAACCATCCATTATCAAATCGCAACGAAAACACCATCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
TPK1ver	AGTTGATTGGTGGTCATTTG
TPK2ver	ATCTATCGTGATTTGAAACC
SCH9ver	GTTGATTTCTGGTCATTAGG
BCY1ver	ATTAGACCGTTTGACATTCC
3' Test HA-tag	CATCGTATGGGTAAAAGATG
Sch9 for	CAACGAAAGTACGTAGAGAAC
Sch9 rev	GCTTCACGGTGTAAAACCTTA
Sch9Sonde for	AACGGTAAACGCAATGACAC
Sch9Sonde rev	CCTCAATTCCGTTCAATCTT
ACT1(RT)f	TTGGATTCTGGTGGTGGTGT

ACT1(RT)r	TGGACAAATGGTTGGTCAAG
SSD1(RT)f	GCACCATTGAGACGTTATGC
SSD1(RT)r	ATAGCTTGCTCTTGGGCATT
SCH9(RT)f	TTTCTGGTCATTAGGAGTGTTGA
SCH9(RT)r	AAAGGATCGACCTTCTGGAC
HYR1(RT)f	CTGAAGCTGGTTCTGGACAA
HYR1(RT)r	GCCTGAATTGGAACCTTGAT
ECE1(RT)f	CTAATGCCGTCGTCAGATTG
ECE1(RT)r	TCGATGGATTGTTGAACACC
SOK1(RT)f	TGATGCCCCGTC AATTAGTTT
SOK1(RT)r	TTTCTTGTTGAACTTTGGCAAT
MSB2(RT)f	AGTTACCGCAGTTGCTCCTT
MSB2(RT)r	CTCGATGGTGTCTCAGCAAT
orf19.1488(RT)f	CTTCAAGACTACGGAAATTTGATAA
orf19.1488(RT)r	GATCATCAATATCAATCAATTCTGTG
HOG1(RT)f	TTTAATGACGCAGACTTGCC
HOG1(RT)r	GTTGTTCGGAACCCTCAGTT
BRG1(RT)f	AGAGGTCCAAAGGGTGTGAG
BRG1(RT)r	TACCTCTTCTGCTGCCAATG
Y2H hin	GTATAACGCGTTTGG AATC

2.5 Transformation

2.5.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Liter LB-Medium wurde mit einer *E. coli*-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (15 min bei 4 °C und 4000 Upm) und zweimal mit sterilem, eiskaltem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml 10 % Glycerin resuspendiert, erneut zentrifugiert und zuletzt in 3 ml 10 % Glycerin resuspendiert. 100 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

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

50 ml LB wurden mit einer *E. coli*-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden auf Eis inkubiert und bei 4 °C für 15 min bei 3500 Upm zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 20 ml RF1-Puffer (100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 15 % Glycerin; pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin; pH 6,8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden 100 µl Aliquots hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Transformation von *E. coli*

2.5.3.1 Elektroporation

50 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 - 10 ng Plasmid-DNA gemischt. Für die Elektroporation wurde ein Gene-Pulser (BioRad) verwendet. Es wurde eine Kapazität von 25 µF, ein Widerstand von 200 Ω und eine Spannung von 1,3 kV eingestellt. Nach erfolgtem Puls wurde 900 µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen bei 37 °C für eine Stunde regeneriert. Zuletzt wurden die Zellen für 5 min bei 3500 Upm zentrifugiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

2.5.3.2 Chemische Transformation

Die Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid (RbCl)-Methode nach Hanahan (1983). 100 µl chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 - 10 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Erneut wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 900 µl LB-Medium versetzt. Zur Regeneration wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 3500 Upm zentrifugiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

2.5.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Methode nach Gietz und Schiestl (1995). 50 ml YPD wurden mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert und bei 30 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 wurden die Zellen 5 min bei 3500 Upm geerntet. Das Zellpellet wurde mit 20 ml sterilem ddH₂O gewaschen, zentrifugiert und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl 100 mM LiAc resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl Zellen verwendet. Diese wurden erneut zentrifugiert und das Pellet wurde mit 240 µl 50 % PEG3350-Lösung, 36 µl 1M LiAc, 25 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und Plasmid-DNA (2 - 5 µg pro Plasmid) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 min. Zuletzt wurden die Zellen zentrifugiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

Die Berechnung der Transformationseffizienz erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{cfu} / \mu\text{g DNA} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien (cfu)} \times \text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \mu\text{g DNA}}$$

2.5.5 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte nach der Methode nach Mitchell (Wilson *et al.*, 2000). Dazu wurde 50 ml YPD mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert. Nachdem die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 erreicht hatte, wurden die Zellen für 5 min bei 3500 Upm geerntet. Das Zellpellet wurde mit 5 ml LATE-Puffer (0,1 M LiAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA; pH 5) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 500 µl LATE-Puffer aufgenommen. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Zellen mit 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) sowie 2 - 10 µg Plasmid-DNA bzw. maximal 80 µl PCR-Produkt versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert, anschließend wurde 700 µl PLATE-Puffer (40 % PEG3350 in LATE-Puffer) zugesetzt. Nachdem die Ansätze kurz geschüttelt wurden, erfolgte eine Inkubation bei 30 °C über Nacht. Es folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden zentrifugiert (3500 Upm, 5 min), zu Regenerationszwecken in 5 ml YPD aufgenommen und für 4 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 150 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8)) aufgenommen und auf Selektivplatten ausplattiert.

2.6 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

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

Für die Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe der Methode nach Birnboim und Doly (1979) wurden zunächst 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde dann für 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl P1-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS). Der Ansatz wurde fünfmal leicht geschwenkt und anschließend wurde 100 µl P3-Puffer (3 M K-Acetat, pH 5,5) dazu pipettiert. Nachdem der Ansatz fünf- bis sechsmal geschwenkt wurde, fand eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C statt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem Ethanol (abs.) versetzt. Nach 10 min bei -20 °C erfolgte erneut eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und zuletzt in 50 µl sterilem ddH₂O aufgenommen. Nun konnte die DNA für Sequenzierungen, Restriktionen und Transformationen verwendet werden.

Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurde das „NucleoSpin® Plasmid“-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) eingesetzt.

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

5 ml einer Übernachtskultur wurden für 5 min bei 3500 Upm geerntet und mit 5 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl P1-Puffer resuspendiert und zusätzlich mit 500 µl P2-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 2/3 Volumen steriler Glasperlen erfolgte der Zellaufschluß mit Hilfe des „FastPrep®-24“ der Firma MP Biomedicals. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 500 µl P3-Puffer versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Isopropanol gefällt und anschließend für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 Upm, 4 °C). Zuletzt wurde das Pellet getrocknet, in 20 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet.

2.6.3 Isolierung von genomischer DNA aus *C. albicans*

Um chromosomale DNA aus *C. albicans* zu isolieren, wurde eine 5 ml Übernachtskultur geerntet und mit 5 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 400 µl SCE / DTT / Zymolyase-Lösung (1 M Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat, 10 mM EDTA (pH 5,8), 5 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 88 µg/ml Zymolyase 100T) resuspendiert und für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Die Ansätze wurden für 5 min bei 3500 Upm zentrifugiert und in 500 µl 50 mM EDTA (pH 8,0) + 50 µl 10 %iger SDS-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 65 °C für 30 min wurde die Suspension auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt, mit 100 µl 5 M Kaliumacetat (pH 6,0) versetzt und für 30 - 90 min auf Eis gekühlt. Nach 15 min bei 13000 Upm wurde der Überstand mit 900 µl eiskaltem Ethanol (abs.) gefällt und für 15 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 400 µl RNase-Lösung (200 µg/ml RNase A, 150 mM Natriumacetat (pH 5,9), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0)) resuspendiert und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dem Ansatz wurden 400 µl Phenol-Chloroform zugegeben und für 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die Phenol-Chloroform-Extraktion wiederholt. Anschließend wurde die obere Phase erneut abgenommen und mit 400 µl Chloroform versehen. Zuletzt wurde die DNA aus der oberen Phase mit 800 µl Ethanol (abs.) über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz für 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet getrocknet und die DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

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

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans* erfolgte nach der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Hierfür wurde eine Hauptkultur für 5 min bei 3500 Upm und 4 °C zentrifugiert und in kleinen Tropfen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Zelltropfen bei -80 °C gelagert.

Die Zellen wurden mittels einer mechanischen Methode aufgeschlossen. Dazu wurden Wolframcarbid-Kugeln und Teflonbehälter 30 min in einer Bentonit-Lösung inkubiert und mit DEPC-H₂O (0,1 % DEPC) gewaschen und abgespült. Anschließend wurden die Kugeln und Behälter in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Zelltropfen wurden zusammen mit einer Wolframcarbit-Kugel in einen Teflonbehälter gelegt und für 2 min bei 2000 Upm in einem „Micro-Dismembrator“ (B. Braun Biotech International) geschüttelt. Das Zellpulver wurde in 2 ml TRIzol® resuspendiert. TRIzol® ist eine Monophaselösung aus Phenol und

Guanidiniumisothiocyanat, welche die Integrität der RNA gewährleistet, während andere Zellbestandteile denaturiert werden. Um die Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu begünstigen wurde der Ansatz für 1 min gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Nach 10 min bei 13000 Upm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 0,4 Probenvolumen Chloroform wurden hinzugefügt, der Ansatz für 15 Sekunden geschwenkt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert, wobei eine farblose Phase (oben), eine Interphase und eine rötliche Phase (unten) entsteht. In Letzterer reichern sich Proteine und Lipide an, in der Interphase DNA und in der oberen Phase RNA. Nun wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 Probenvolumen Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 13000 und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 500 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Durch Zugabe von 500 µl LiCl-Puffer (4 M LiCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA) wurde die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 30 min bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert, zweimal mit 1 ml 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und dann bei RT getrocknet. Zuletzt wurde die RNA in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Alternativ wurde das „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche nach Herstellerangaben verwendet.

2.6.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe wurde mittels elektrophoresischer Auftrennung durchgeführt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 - 2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde UltraPure™ Agarosepulver (Invitrogen) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml Lösung versetzt. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit Probenpuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versehen. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte unter UV-Licht (254 nm). Als Größenstandard wurde, falls nicht anders vermerkt, ein 1 kb DNA-Leiter (MBI Fermentas) mit folgenden, definierten Bandengrößen verwendet (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.

2.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Banden aus einem Agarosegel zu isolieren, wurden sie mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem „NucleoSpin® Extract II“-Kit von Marcherey-Nagel (Düren) weiter verarbeitet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Nach erfolgter Isolierung konnten die Fragmente für Transformationen verwendet werden.

2.6.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte direkt für Transformationen oder für Sequenzierungen zu verwenden, wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

2.6.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren konnte mit Hilfe des „NanoDrop 2000c“ Spektrophotometers der Firma Peqlab (Erlangen) ermittelt werden. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} dargestellt, der bei 1,8 - 2,0 liegen sollte.

2.6.9 Restriktion von DNA

Die Behandlung von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firmen Roche, New England Biolabs und MBI Fermentas. Die Restriktion erfolgte nach Angabe des Herstellers.

2.6.10 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungsanalysen von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden 0,6 - 0,7 µg DNA versendet.

2.6.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.6.11.1 Standard-PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten durch spezifisch gewählte Primer-DNA gezielt DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die PCR-Reaktionen wurden in einem „Thermocycler“ (Biometra) durchgeführt. In der Regel hatte ein PCR-Ansatz ein Volumen von 50 µl und enthielt folgende Komponenten: 10 - 150 ng DNA-Template, 1 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 10 mM), je 1 µl (20 µM) des 5'- und 3'-Primers, 5 µl 10x Puffer, 2 - 5 U Polymerase und ddH₂O. Für PCR-Fragmente, die für Transformationen eingesetzt werden sollten, wurde die „Expand™ High Fidelity“-Polymerase (Roche) verwendet. PCR-Reaktionen, die der Verifikation dienten, wurden mit der „Taq DNA Polymerase“ (NEB) amplifiziert. Nach einer Denaturierung des PCR-Ansatzes für 2 min bei 95 °C wurde die DNA über 30 Zyklen für präparative DNA-Amplifikationen und 36 Zyklen für Verifikationen amplifiziert. Die Annealing- und Elongationstemperatur der PCR wurden den verwendeten Primern (Tabelle 2.5) und der Größe des PCR-Produkts angepasst.

2.6.11.2 Kolonie-PCR

Um eine erfolgreiche Integration von DNA nach erfolgter Transformation zu verifizieren, wurde eine PCR mit einer ganzen Kolonie durchgeführt. Hierfür wurde etwas Zellmaterial einer Kolonie in 0,02 M NaOH sorgfältig resuspendiert und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend dienten 2 - 4 µl dieser Suspension als Template für einen PCR-Ansatz. Der erste Denaturierungsschritt wurde hierbei auf 10 min verlängert.

2.6.11.3 Quantitative Real-Time-PCR

Um die Transkriptspiegel von Genen bestimmen und vergleichen zu können, wurde die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) angewendet. Diese beruht auf dem Prinzip der regulären PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich zu der Amplifikation eines Produktes eine Quantifizierung der neu entstandenen DNA während der Amplifikationsdauer, also in Echtzeit. Die

Quantifizierung erfolgt nach jedem abgeschlossenen Zyklus durch zugesetzte Fluoreszenzmoleküle, die an die neu gebildeten DNA-Produkte binden. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der bei einer Wellenlänge von 475 nm angeregt wird und bei 520 nm emittiert. Da der Farbstoff sequenzunspezifisch bindet, wurde das Produkt mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse überprüft. Alternativ wurde der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (Bio-Budget) verwendet.

2.6.11.3.1 DNase-Behandlung

Nachdem die Gesamt-RNA aus *C. albicans*-Stämmen isoliert worden war (Abschnitt 2.6.4), erfolgte eine DNase-Behandlung der Ansätze mit dem „TURBO DNA-free™ Kit“ von Ambion. 8 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl TURBO DNase, 2 µl TURBO DNase-Puffer und DEPC-H₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des „RNA Clean & Concentrator™-5“-Kits von Zymo Research nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.6.11.3.2 cDNA-Synthese

Um die Expression von Genen durch qPCR analysieren zu können, musste die mRNA in komplementär-DNA (cDNA) revers transkribiert werden. Für die reverse Transkriptase-Reaktion (RT) wurde das „AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis Kit“ von Stratagene nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA synthetisiert. Von jeder RNA-Probe, die bei der qPCR verwendet werden sollte, wurde eine „NoRT“-Kontrolle angefertigt. Diese wurde ebenfalls gemessen und diente zur Kontrolle von DNA-Kontaminationen.

2.6.11.3.3 Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Für die qPCR wurde der „Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix“ von Agilent Technologies oder der „my-budget 5x EvaGreen® QPCR Mix II“ (Bio-Budget) verwendet. Die Messung der Proben erfolgte in einem Mx3000P (Stratagene) in 96-well PCR-Platten, welche mit Folie verschlossen wurden. Die Experimente wurden mit jeweils 2 biologischen Replikaten durchgeführt, wobei von jeder Probe eine „NoRT“-Kontrolle angefertigt wurde.

Vor dem Start der qPCR wurde dem „Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix“ der beigefügte Referenzfarbstoff ROX (Carboxy-X-Rhodamin; 1 mM) hinzugefügt. Dazu wurde ROX 1:500 mit DEPC-H₂O verdünnt und 75 µl der Verdünnung dem Master Mix (2,5 ml) hinzugefügt. Der Referenzfarbstoff dient dazu Volumenschwankungen zu berücksichtigen. Nach der Synthese der cDNA (Abschnitt 2.6.11.3.2) wurde diese 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt und für die Messungen verwendet. Von jedem biologischem Replikat wurden drei technische Replikate gemessen.

Es wurde jeweils folgender PCR-Ansatz hergestellt:

cDNA (1:10 Verdünnung)	10 µl
2x Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (+ROX)	12,5 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	1,25 µl
Primer revers (10 pmol/µl)	1,25 µl

	25 µl

Die Primer für die Durchführung der qPCR wurden mit Hilfe des „GenScript Real-Time-PCR (TaqMan) Primer Design“-Programms (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>) ausgewählt. Für die Normalisierung des Transkriptspiegels wurde Aktin als Referenzgen eingesetzt. Für alle cDNA-Proben wurden dafür zusätzlich die Primer ACT1(RT)f und ACT1(RT)r verwendet. Zusätzlich zu den „NoRT“-Ansätzen wurden weitere Kontrollen durchgeführt: Von jedem Primerpaar wurde eine Kontrolle ohne cDNA angesetzt („No Template Control“, NTC). Somit konnte die Entstehung von Primer-Dimeren sowie eine mögliche DNA-Kontamination ausgeschlossen werden.

Die Messungen wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

Aktivierung	95 °C	10 min	} 40x
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Annealing	60 °C	60 sec	
Extension	72 °C	30 sec	

Um Nebenprodukte, die bei der PCR entstehen können, zu identifizieren wurde nach der Messung eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus wurden die Produkte zunächst 1 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 55 °C gesenkt, wobei die DNA wieder zusammengeführt wird. Bei der nun folgenden Erhöhung der Temperatur von 55 °C auf 95 °C (0,2 °C/sec) wurde die Fluoreszenz stetig gemessen und als Schmelzkurve (Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur) dargestellt. Jedes PCR-Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur, bei welcher das Produkt zu 50 % in Einzelsträngen vorliegt. Durch die Freisetzung des vorher gebundenen SYBR Greens kommt es nach dem Erreichen der Schmelztemperatur zu einem Abfall in der Fluoreszenzintensität, welcher als Peak dargestellt wird. Entstehen Nebenprodukte, würden mehrere Peaks sichtbar werden.

A) Effizienz

Idealerweise verdoppelt sich die zu amplifizierende DNA nach jedem Zyklus der PCR. Durch den Verbrauch der Substrate, die Akkumulation von Produkten sowie die abnehmende Aktivität der Polymerase kommt es nicht zu einer 100 %igen Amplifikation („2“) der Sequenz. So liegt die Effizienz der Messung jeweils zwischen 1 (keine Amplifikation) und 2 (Verdopplung).

Um die Primer-Effizienz zu bestimmen, wurde bei jedem Experiment eine Standardkurve für jedes Primerpaar erstellt. Dazu wurde ein cDNA-Mix („Pool“) aus den zu untersuchenden cDNA-Proben hergestellt und Verdünnungen (1:10 bis 1:10000) verwendet. Von jeder

Verdünnungsstufe wurden ebenfalls drei technische Replikate gemessen. Aus der Steigung der Standardkurve konnte die Effizienz mit folgender Gleichung errechnet werden:

$$\text{Effizienz} = 10^{- (1/\text{Steigung})}$$

B) Auswertung der qPCR

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach jedem Zyklus. Für die Quantifizierung der Messung wird der sogenannte Ct-Wert („Cycle threshold“) verwendet. Dieser Wert gibt an, in welchem Zyklus erstmals ein konstantes Fluoreszenzsignal erzeugt werden kann, welches die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

Für die Berechnung des relativen Transkriptspiegels wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Relativer Transkriptspiegel (RTS)} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Aktin}})^{\text{Ct}_{\text{Aktin}}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\text{Ct}_{\text{Zielgen}}}}$$

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

(Southern, 1975)

2.6.12.1 DNA-Restriktion

Für die Southern-Blot-Analyse wurden 1,5 µg chromosomale DNA bei der Restriktion eingesetzt. Diese wurde für 2 bis 3 Tage mit jeweils 20 U des entsprechenden Enzyms in einem Endvolumen von 200 µl geschnitten. Die Restriktion der DNA wurde durch ein analytisches Agarosegel kontrolliert. Nach der Restriktion erfolgte eine Fällung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (abs.). Die Ansätze wurden über Nacht bei -20 °C inkubiert, zentrifugiert (15 min 13000 Upm) und das Pellet nach dem Trocknen in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Als Größenstandard diente mit *HindIII* geschnittene λ-DNA, welche folgende Fragmentgrößen lieferte (bp): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125.

2.6.12.2 Sondenmarkierung

Zur Markierung der Sonde wurde das „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ der Firma Roche verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurden die „DIG-dUTPs“ in einem Verhältnis von 1:5 mit dem Nukleotid-Mix verdünnt. Außerdem wurden zur Amplifikation in der PCR-Reaktion 50 Zyklen eingesetzt.

2.6.12.3 Transfer auf eine Nylonmembran durch Kapillar-Blot

Die chromosomale DNA wurde nach erfolgter Restriktion (Abschnitt 2.6.12.1) auf ein 0,8 %iges Gel aufgetragen und bei 15 V aufgetrennt. Vor dem Transfer auf eine positiv geladene Membran (Hybond N-Nylonmembran, Amersham) mittels Kapillar-Blot, wurde das Agarosegel unter UV-Licht fotografiert. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl depuriniert und anschließend für 15 min in NaOH denaturiert. Für den Kapillar-Blot wurden

Papiertücher auf eine ebene Fläche gelegt. Drei Lagen Whatman-Papier und die Nylonmembran wurden in 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7) getränkt und auf die Papiertücher gelegt. Nachdem das Agarosegel möglichst ohne Luftblasen auf die Membran gelegt wurde, wurde ein längeres Whatman-Papier aufgelegt, welches mit einem Ende in einem Behälter mit 20x SSC-Puffer eingetaucht war. Zuletzt wurden eine Glasplatte sowie ein Gewicht (0,5 - 1 kg) aufgelegt, um die Konstruktion zu beschweren. Die Transferzeit betrug 2 bis 3 Stunden. Die Membran wurde anschließend getrocknet. Durch Inkubation für 5 min bei UV-Licht wurde die DNA durch Crosslinking kovalent an die Membran gebunden.

2.6.12.4 Hybridisierung und Detektion

Vor der Hybridisierung wurde die Membran in eine Folie mit Prähybridisierungspuffer (5x SSC, 1x NRB2, 0,02 % SDS, 0,1 % N-Lauroylsarcosinat) eingeschweißt und für 1 Stunde in einem Wasserbad bei 68 °C inkubiert. Weiterhin wurde die vorher markierte Sonde für 10 min bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis gestellt, bevor sie in 5 ml Prähybridisierungspuffer resuspendiert wurde. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte über Nacht bei 68 °C im Wasserbad. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 5 min mit NRW1-Puffer (2x SSC, 0,1 % SDS) bei RT und zweimal für 15 min mit NRW2-Puffer (0,1x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 1 min bei RT mit NRB1-Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; pH 7,6) gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei RT in NRB2 (1 % (w/v) Blocking Reagent (Roche) in NRB1-Puffer) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit NRB1 abgespült und für 45 min mit 4 µl Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Antikörper (Roche) in 20 ml NRB2 inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe für 15 min mit NRB1, woraufhin die Membran mit NRB3 (100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 10 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) abgespült wurde. Anschließend konnte die Membran mit 45 µl NBT (50 mg/ml in 70 % DMF) und 35 µl X-Phosphat (50 mg/ml in 100 % DMF) in 10 ml NRB3-Puffer im Dunkeln entwickelt werden.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Isolation von Rohextrakten aus *C. albicans*

Der Zellaufschluß zur Herstellung von Proteinrohextrakten wurde mit dem „FastPrep®-24“ von MP Biomedicals durchgeführt. 50 ml *C. albicans*-Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1 inkubiert und anschließend für 5 min bei 3500 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 30 ml sterilem ddH₂O gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend bei -20 °C über Nacht oder bei -80 °C für 2 Stunden eingefroren. Das Pellet wurde aufgetaut, in 400 - 600 µl Lysispuffer (20 mM CAPSO (pH 9,5), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Imidazol, 0,1 % Triton-X-100) mit Proteaseinhibitor (Roche, 1 Tablette/10 ml Puffer) aufgenommen, in 2 ml Kryoröhren überführt und mit einem Volumen steriler Glasperlen versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s in 6 Zyklen von jeweils 40 Sekunden, wobei die Proben nach jeweils 2 Zyklen auf Eis abgekühlt wurden. Zuletzt wurden die Zelltrümmer bei 13000 Upm für 10 min bei 4 °C vom Rohextrakt getrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Proteinkonzentration von Rohextrakten zu messen, wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bei Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Bradford Reagenz (Bio-Rad) wurde 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Jeweils 200 µl der Lösung wurden pro Ansatz in eine Mikrotiterplatte pipettiert. 5 µl der 1:10 bis 1:20 verdünnten Rohextrakte wurden dazu pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Standard diente eine Eichgerade, die mit 1-15 µg Rinderserumalbumin (BSA) erstellt wurde.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die Methode nach Laemmli (1970) modifiziert. In dieser Arbeit wurde die „XCell SureLock™ Mini-Cell“-Gelapparatur (Invitrogen) mit 8 oder 10 %igen SDS-Gelen (Pierce) verwendet. Als Laufpuffer diente ein HEPES-Puffer (100 mM Tris, 100 mM HEPES, 1 % (w/v) SDS). Bevor die Proben auf das Gel geladen wurden, wurden sie mit 2x SDS-Probenpuffer (4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % (v/v)-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Als Größenstandard diente der „PageRuler™“ (prestained) von Fermentas. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 - 120 mA für 30 bis 45 min. Anschließend wurde das Gel mit der Färbelösung „Bio-Safe™ Coomassie stain“ von Bio-Rad gefärbt oder für eine Immunoblot-Analyse verwendet.

2.7.4 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine konnten mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran, Millipore) transferiert werden. Zur Aktivierung der Membran wurde diese vor dem Transfer 1 min in Methanol inkubiert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und 15 Volt oder für 3 bis 4 Stunden bei 40 Volt in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol). Nach dem Transfer wurde die Membran in 5% Magermilchpulver in TBST-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20) für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Dieser Schritt diente der Blockierung von unspezifischen Bindestellen. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Zwischenzeitlich wurde der Primärantikörper in einer entsprechenden Verdünnung in TBST-Puffer pipettiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 Stunde bei RT. Nachdem die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher ebenfalls in TBST-Puffer verdünnt wurde. Zuletzt wurde die Membran erneut gewaschen und die Detektion konnte durchgeführt werden. Es wurde das Chemilumineszenz-Substrat „SuperSignal® West Dura“ der Firma Pierce nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Lumineszenzdetektor „LAS 4000 mini“. Die Lumineszenzsignale konnten mit dem Programm „MultiGauge“ (Fujifilm) ausgewertet werden.

Primärantikörper: (1-7), Anti-HA, monoklonal, Ratte; 1:1000 (Roche)

Sekundärantikörper: (2-11), Anti-Ratte, Peroxidase-konjugiert; Ziege; 1:10000 (Pierce)

2.7.5 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Für die Chromatinimmunpräzipitation unter Hefewachstumsbedingungen wurden *C. albicans*-Stämme in 50 ml YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C angezogen. Für Experimente unter Hypheninduktionsbedingungen wurde 250 ml YP-Medium verwendet, welches bei 37 °C vortemperiert wurde. *C. albicans*-Übernachtskulturen wurden in 5 ml sterilem ddH₂O gewaschen und in YP-Medium aufgenommen. Die Hauptkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert, mit 10 % (v/v) Pferdeserum zur Induktion der Hyphenbildung versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Quervernetzung von Protein-DNA- bzw. Protein-Protein-Verbindungen wurde den Kulturen frisch angesetztes 30 %iges Formaldehyd (Endkonzentration: 1 %) zugesetzt. Die Kulturen wurden für 30 min bei RT fixiert. Der Vorgang wurde durch Zugabe von 2,5 M Glycin (Endkonzentration: 125 mM) und Inkubation für weitere 5 min bei RT abgestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 3500 Upm geerntet, zweimal mit 30 ml eiskaltem TBS-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl) gewaschen, in 1 ml TBS-Puffer resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und so konnten die Zellen bei -80 °C über Nacht gelagert werden. Am nächsten Tag wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in 500 µl Lysispuffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Natriumdeoxycholat) mit Proteaseinhibitor (Roche, 1 Tablette/10 ml Puffer) resuspendiert. Vor dem Zellaufschluß mit dem „FastPrep®-24“ wurde der Ansatz mit einem Volumen steriler Glasperlen versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s in 16 Zyklen von jeweils 40 Sekunden, wobei die Proben nach jeweils 2 Zyklen auf Eis abgekühlt wurden. Um die Glasperlen und Zelltrümmer von der Probe zu trennen, wurde mit Hilfe einer erhitzten Kanüle (26G, Terumo) ein Loch in den unteren Bereich des Kryoröhrchens gestochen. Das Röhrchen wurde mit geöffnetem Deckel in ein 14 ml Greiner-Röhrchen gesetzt und die Probe für 2 min bei 500 Upm zentrifugiert. Das Lysat konnte nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Nach Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min und 4 °C konnte der Überstand verworfen werden. Das unlösliche, quervernetzte Chromatin befand sich somit im Pellet, welches in 500 µl Lysispuffer resuspendiert wurde. Die Fragmentierung des Chromatins erfolgte mit Hilfe des „Sonifier B-15“ (Branson) mit folgenden Einstellungen: Output control: Stufe 4; continous. Jede Probe wurde 17 Mal für 30 Sekunden sonifiziert, wobei die Probe nach jedem Beschallungsschritt 30 Sekunden auf Eis gekühlt wurde. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert und das (nun lösliche) Chromatin im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende Immunpräzipitation wurden Protein G-Beads (Dynabeads, Invitrogen) verwendet. Damit sich die Beads von den löslichen Komponenten trennen können, wurde ein Magnet-Ständer verwendet. Für die folgenden Schritte wurde dafür das Reaktionsgefäß mit den Beads für ca. 2 min in den Magnet-Ständer gestellt. Somit konnte der Überstand von den Beads entfernt werden. Bei Bedarf wurde das Reaktionsgefäß vor der Positionierung in den Magnet-Ständer für 15 Sekunden bei 10000 Upm abzentrifugiert.

50 µl der magnetischen Beads wurden pro Ansatz in ein Reaktionsgefäß pipettiert, zweimal mit Citrat-Phosphat-Puffer (24,5 mM Zitronensäure, 51,5 mM Na₂PO₄ (pH 5,0), 0,01 % Tween-20) gewaschen und in 200 µl desselben Puffers resuspendiert. Es wurden 8 µl Anti-HA-Antikörper (monoklonal, aus der Ratte; Roche) hinzugefügt und der Ansatz für 4 Stunden auf einem Kippschüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads erneut mit 500 µl Citrat-Phosphat-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Das fragmentierte

Chromatin wurde zu den Bead-Antikörper-Komplexen pipettiert und für die Immunpräzipitation über Nacht bei 4 °C auf einem Kippschüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Beads zweimal mit 1 ml Lysispuffer, zweimal mit 1 ml Lysispuffer II (Lysispuffer mit 500 mM NaCl), zweimal mit 1 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 250 mM LiCl, 0,5 % Nonidet P-40 (NP40), 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA) und einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden dabei die Proben solange geschwenkt, bis der Ansatz resuspendiert war (ca. 2 min). Die Waschschrift erfolgten bei RT, jedoch wurden die Puffer bei 4 °C vorgekühlt. Die Proben wurden zweimal durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 1 % SDS) und Inkubation bei 65 °C eluiert. Die Eluate wurden im Anschluss vereinigt. Die Entfernung von Protein-DNA- bzw. Protein-Protein-Verbindungen erfolgte durch eine Übernachtinkubation bei 65 °C. Um die Proteine abzubauen wurde den Proben am nächsten Tag 250 µl TE-Puffer, 2,5 µl Glykogen (20 mg/ml, Roche), 15 µl 10 % SDS und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche) zugesetzt und der Ansatz für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierfür wurde die Probe zweimal mit 400 µl Phenol-Chloroform und einmal mit 400 µl Chloroform extrahiert. Zu der Probe wurden 16 µl 5 M NaCl und 1 ml Ethanol (abs.) gegeben und der Ansatz bei -20 °C über Nacht gefällt. Der Ansatz wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, für 15 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert und nach dem Trocknen bei RT in 40 µl TE-Puffer resuspendiert. Um RNA-Verunreinigungen zu entfernen wurde 1 µl RNase-Lösung (10 mg/ml, Qiagen) dazu pipettiert und der Ansatz für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) konnten die Proben aufgereinigt werden. Folgende Abweichungen von den Herstellerangaben wurden dabei eingesetzt: Es wurde Bindepuffer ohne Indikator verwendet. Der Waschschrift mit PE-Puffer erfolgte zweimal, wobei das Säulchen nach dem zweiten Waschschrift in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Vor dem Eluieren wurde die Probe 2 min zum Abdampfen stehen gelassen und die DNA wurde zweimal mit je 30 µl EB-Puffer (1:3 mit ddH₂O verdünnt) eluiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.6 ChIP-chip

Die ChIP-chip-Methode ist eine Kombination aus einer Chromatinimmunpräzipitation (ChIP, Abschnitt 2.7.5) und einem DNA-Microarray (chip). In dieser Arbeit wurde die genomweite Lokalisation der PKA-Isoformen Tpk1, Tpk2 unter Hefe- und Hyphenwachstumsbedingungen untersucht. Weiterhin wurden ChIP-chip-Analysen für die regulatorische Untereinheit der PKA (Bcy1) sowie die B-Typ Kinase Sch9 unter Hefewachstumsbedingungen angefertigt. Zusätzlich wurden die Bindestellen von Sch9 unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Für die ChIP-chip-Methode wurden die Stämme AF1004, AF1005, AF1006 und AF1007 verwendet, die jeweils mit einem HA-Epitop versehene Kinasen produzieren. Als Kontrollstamm wurde der jeweilige heterozygote Stamm (II, TPK7 und CAS1), bzw. im Falle von Bcy1 der Wildtypstamm CAF2-1 verwendet. Tabelle 2.6 zeigt eine Übersicht der Bedingungen und der verwendeten Stammkombinationen. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate angefertigt.

Tab. 2.6: Für ChIP-chip-Analysen verwendete Stämme und Wachstumsbedingungen.

Kontroll-Stamm	Genotyp	IP-Stamm	Genotyp	Bedingungen
II	<i>TPK1/tpk1</i>	AF1004	<i>TPK1^{HA}/tpk1</i>	Hefewachstum
II	<i>TPK1/tpk1</i>	AF1004	<i>TPK1^{HA}/tpk1</i>	Hypheninduktion
TPK7	<i>TPK2/tpk2</i>	AF1005	<i>TPK2^{HA}/tpk2</i>	Hefewachstum
TPK7	<i>TPK2/tpk2</i>	AF1005	<i>TPK2^{HA}/tpk2</i>	Hypheninduktion
CAS1	<i>SCH9/sch9</i>	AF1006	<i>SCH9^{HA}/sch9</i>	Hefewachstum
CAF2-1	<i>BCY1/BCY1</i>	AF1007	<i>BCY1^{HA}/BCY1</i>	Hefewachstum

Nach der Chromatinimmunpräzipitation war die DNA-Konzentration für die anschließende Markierung und Array-Hybridisierung zu gering. Aus diesem Grund musste sie vorher mit Hilfe des „GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification“-Kits (WGA2, Sigma) vervielfältigt werden. Um das Kit anwenden zu können, musste das Volumen der Proben eingeeengt werden. Dazu wurden jeweils 40 µl lyophilisiert (ALPHA1-4, Christ) und die Proben anschließend in 10 µl ddH₂O aufgenommen. Abweichend von den Herstellerangaben wurde der erste Denaturierungsschritt nicht durchgeführt. Dieser war nicht notwendig, da er der Fragmentierung diente und die Proben bereits durch Sonifizierung fragmentiert worden waren. Anschließend wurden die Proben erneut mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des „NanoDrop 2000c“ Spektrophotometers bestimmt. Da die DNA-Konzentration immer noch zu gering war, wurde anschließend das „GenomePlex® WGA Reamplification Kit“ (WGA3, Reamplification Procedure A, Sigma) eingesetzt. Um die korrekte Fragmentierung zu kontrollieren, wurden die Proben nach erneuter Aufreinigung auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. In der Regel konnte man einen DNA-Schmier zwischen 200 bp und 1000 bp erkennen. Letztendlich wurden 2 µg an die Firma Source BioScience (Berlin) geschickt. Dort wurde die Kontroll-ChIP-Probe des Kontrollstamms (Input) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 und die Anreicherungs-ChIP-Probe des IP-Stamms (Enriched) mit Cy5 markiert. Die Proben wurden anschließend vereinigt und auf einem ChIP-DNA-Array hybridisiert. Hierbei handelt es sich um einen *C. albicans*-spezifischen „Whole Genome Tiling Array“, der auf dem Assembly 21 des *C. albicans*-Genoms beruht. Durch die Verwendung von überlappenden Oligonukleotiden sind auf dem Array insgesamt 381308 Oligonukleotidsequenzen mit einer Sequenzlänge von jeweils 50 - 75 bp zu finden. Der GC-Gehalt der Oligonukleotide lag bei 36,5 %, die Schmelztemperatur (T_m) bei ca. 76 °C. Die Arrays wurden von der Firma Roche NimbleGen bezogen (090722_CA_JM_ChIP, OID 23054).

Nach der Hybridisierung erfolgten mehrere Waschschrte und anschließend konnte die Intensität der Fluoreszenzsignale mit Hilfe der „NimbleScan“-Software gemessen werden. Bei jeder Oligonukleotidsequenz wurde das Verhältnis zwischen der Anreicherungsprobe (Cy5-markiert) und der Kontrollprobe (Cy3-markiert) festgehalten. Dieses berechnete Verhältnis wurde als „log₂-ratio“ bezeichnet und anschließend skaliert, um das Verhältnis gegen Null zu zentrieren. Hierfür wurde der „bi-weight-Mittelwert“ über alle log₂-ratios gebildet und von jedem einzelnen Wert subtrahiert. Diese „scaled log₂-ratio“ ist die Grundlage für die Detektion von signifikanten Binderegionen, welche als Peaks dargestellt werden. Überschritten in einem Sequenzfenster von 500 bp vier oder mehr Signale einen Schwellenwert („cutoff-value“), wurde diese Binderegion als signifikant definiert und als

Peak dargestellt. Die identifizierten Peaks wurden mit Hilfe der FDR (false discovery rate)-Werte farblich kodiert. Je kleiner der FDR-Wert, desto wahrscheinlicher ist es, dass diese Region eine Bindestelle des untersuchten Proteins darstellt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer Binderegion bei roten Peaks ($FDR \leq 0,05$) am größten, orangene ($FDR \leq 0,1$) und gelbe ($FDR 0,1 - 0,2$) Peaks stellen weniger wahrscheinliche Binderegionen dar und graue Peaks ($FDR > 0,2$) sind an unwahrscheinlichen Binderegionen lokalisiert. Die Visualisierung der scaled \log_2 -ratios (GFF-Dateien) sowie der daraus resultierenden Peaks (FindPeaks-Dateien) erfolgte mit dem „SignalMap“-Programm (Version 1.9).

2.7.7 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay-Assay“)

Für die Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase wurde die Methode von Suckow und Hollenberg (1998) modifiziert. Dazu wurden die erhaltenen Transformanten auf Selektivmedium ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. 50 mg Agarose wurden in 5 ml ddH₂O aufgekocht und mit 5 ml erwärmtem Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7) vereint. Zu der Lösung wurden 200 μ l 10 %ige SDS-Lösung sowie 200 μ l X-Gal/DMF-Lösung (40 mg/ml) pipettiert. Die Selektivplatten wurden zügig mit der Lösung überschichtet und anschließend zwischen 30 min und 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Eine eventuell auftretende Blaufärbung wurde fotografisch dokumentiert.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Immunfluoreszenz

2.8.1.1 Fixieren der Zellen

20 ml YPD wurden mit einer *C. albicans*-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C inkubiert. Für Untersuchungen unter Hypheninduktionsbedingungen wurden 20 ml YP bei 37 °C vorgewärmt. Nach erfolgter Inokulation wurde das Hyphenwachstum mit 10 % (v/v) Pferdeserum induziert, wobei die Kulturen für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurden. Für die Fixierung der Zellen wurde den Kulturen Formaldehyd (Endkonzentration: 4 %) zugesetzt. Die Kulturen wurden für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden 5 ml (Hefewachstumsbedingungen) bzw. 10 ml (Hypheninduktionsbedingungen) der Kulturen geerntet (3500 Upm, 5 min), die Pellets mit 5 ml S-Puffer (50 mM HEPES, 1,2 M Sorbitol; pH 7,5) gewaschen und in 1 ml S-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8.1.2 Herstellung der Präparate

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen zunächst sphäroplastisiert. Den fixierten Zellen wurden dafür folgende Komponenten (pro 1 ml Zellsuspension) hinzugefügt: 40 μ l Zymolyase 100T (2,5 mg/ml, MP Biomedicals), 30 μ l Glucuronidase (Sigma) und 10 mM DTT (10 μ l 1M DTT). Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Bildung von Sphäroplasten wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 5000 Upm), in 1 ml S-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und 5

min bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (2 min, 5000 Upm) und in 200 µl S-Puffer aufgenommen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie der Zellen wurden Polylysin-beschichtete Objektträger verwendet. Dazu wurden 15 µl einer 0,1 %igen Polylysin-Lösung (Sigma) auf ein rundes Deckglas pipettiert und für 2 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt, die Polylysin-Schicht dreimal mit ddH₂O gewaschen und bei RT ca. 10 min getrocknet. Um die Zellen auf der Polylysin-Matrix zu fixieren, wurden 20 µl der behandelten Zellsuspension auf das Deckglas pipettiert und für 5 min inkubiert. Die angehefteten Zellen wurden viermal mit PBS-Puffer (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen und mussten dabei stets von Puffer benetzt bleiben. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation der Zellen mit 2 % Milchpulver in PBS. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und der primäre Antikörper (Anti-HA aus der Ratte) 1:100 in der Blockierlösung verdünnt. 40 µl dieser Verdünnung wurden auf das Deckglas pipettiert und die Proben für 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der sekundäre, fluorophorgekoppelte Antikörper (Anti-Ratte, FITC-konjugiert) wurde nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS 1:100 in 0,2 % Milchpulver/PBS verdünnt. 40 µl der Verdünnung wurden auf das Deckglas pipettiert und die Ansätze anschließend für 90 min in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Zur Fluoreszenzfärbung des Kerns wurde nach dem Waschen mit PBS 20 µl DAPI (1 µg/ml) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Flüssigkeit gründlich entfernt. Um einen Verlust der Fluoreszenz („Photobleichung“) der Präparate zu verhindern, wurde ein Tropfen „Antifade“ (Pro-Long® Gold Antifade, Sigma) auf das Deckglas gegeben. Anschließend wurde ein Objektträger vorsichtig auf das Deckglas gedrückt. Die Aushärtung erfolgte nach Herstellerangaben für 24 Stunden im Dunkeln. Bei Bedarf wurde die Probe zusätzlich luftdicht mit Nagellack versiegelt und konnte so auch längere Zeit im Dunkeln aufbewahrt werden.

Primärantikörper: (1-7), Anti-HA, monoklonal, Ratte (Roche)

Sekundärantikörper: (2-4), Anti-Ratte, FITC-konjugiert, Ziege (Jackson Immunologie Research Lab. Inc.)

2.8.1.3 Mikroskopie der Präparate

Die angefertigten Präparate wurden mit Hilfe eines Spinning-Disc-Konfokalmikroskops (Cell Observer® SD; Zeiss / Center for Advanced Imaging (CAi), Düsseldorf) mikroskopiert. Mit diesem Mikroskop werden zwei Fluoreszenzsignale simultan von zwei Kameras detektiert. Somit war es möglich die FITC- gleichzeitig mit der DAPI-Fluoreszenz zu detektieren. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit Hilfe des Programms „ZEN 2011“ (Zeiss).

3 Ergebnisse

Der Dimorphismus ist für die Virulenz des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* von großer Bedeutung. Als einzelliger Pilz (Hefe) kann *C. albicans* leicht im Blut transportiert werden, wohingegen die Hyphenform die Adhäsion an Epithelzellen sowie die Transmigration durch Gewebezellen ermöglicht (Odds, 1994). AGC-Kinasen, wie die Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase B (PKB), spielen bei der Steuerung des Dimorphismus eine bedeutende Rolle. Die PKA besteht aus einer inhibierenden regulatorischen Untereinheit (Bcy1) sowie den zwei Isoformen der katalytischen Untereinheit (Tpk1 und Tpk2). Letztere aktivieren den Transkriptionsfaktor Efg1, welcher die Hyphenbildung bei Normoxie induziert und bei Hypoxie reprimiert. Die PKB Sch9 begrenzt die Ausbildung von Hyphen unter hypoxischen Bedingungen und in Anwesenheit von hohen CO₂-Konzentrationen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die zelluläre und genomische Lokalisation der AGC-Kinasen untersucht werden, um Signalwege der AGC-vermittelten Hyphenbildung zu klären.

3.1 Markierung von Tpk1, Tpk2, Sch9 und Bcy1 mit einem HA-Epitop

Für die Klärung der Lokalisation der AGC-Kinasen wurden Stämme konstruiert, in denen die Proteine mit einem Epitop markiert sind. In dieser Arbeit wurde das Hämagglutinin (HA)-Epitop gewählt, für dessen Detektion monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich sind. In den hergestellten *C. albicans*-Stämmen wurden die Kinasen mit einem dreifachen HA-Epitop am C-Terminus versehen. Hierfür wurde das Plasmid p3HA-URA3 verwendet, das die Sequenz für das 3xHA-Epitop sowie den URA3-Marker trägt. Mittels PCR mit den Primerpaaren Tpk1-HA for/rev, Tpk2-HA for/rev, Sch9-HA for/rev sowie Bcy1-HA for/rev wurde die 3xHA-URA3-Sequenz des Plasmids amplifiziert. Um eine Integration in das Genom von *C. albicans* durch homologe Rekombination zu gewährleisten wurden die Primer so konstruiert, dass sie eine mindestens 70 bp lange Sequenzhomologie zu den 3'-Enden der ORFs der AGC-Kinasen beinhalten. Die homologe Sequenz bricht dabei vor dem Stoppcodon ab. Durch die Primersequenz wurden außerdem drei Glycine als Linker zwischen Kinase und HA-Epitop kodiert, um die Funktionalität der Kinasen nicht durch das Epitop zu beeinflussen. In Abb. 3.1 ist exemplarisch das Schema der HA-Epitop-Markierung von Tpk2 dargestellt.

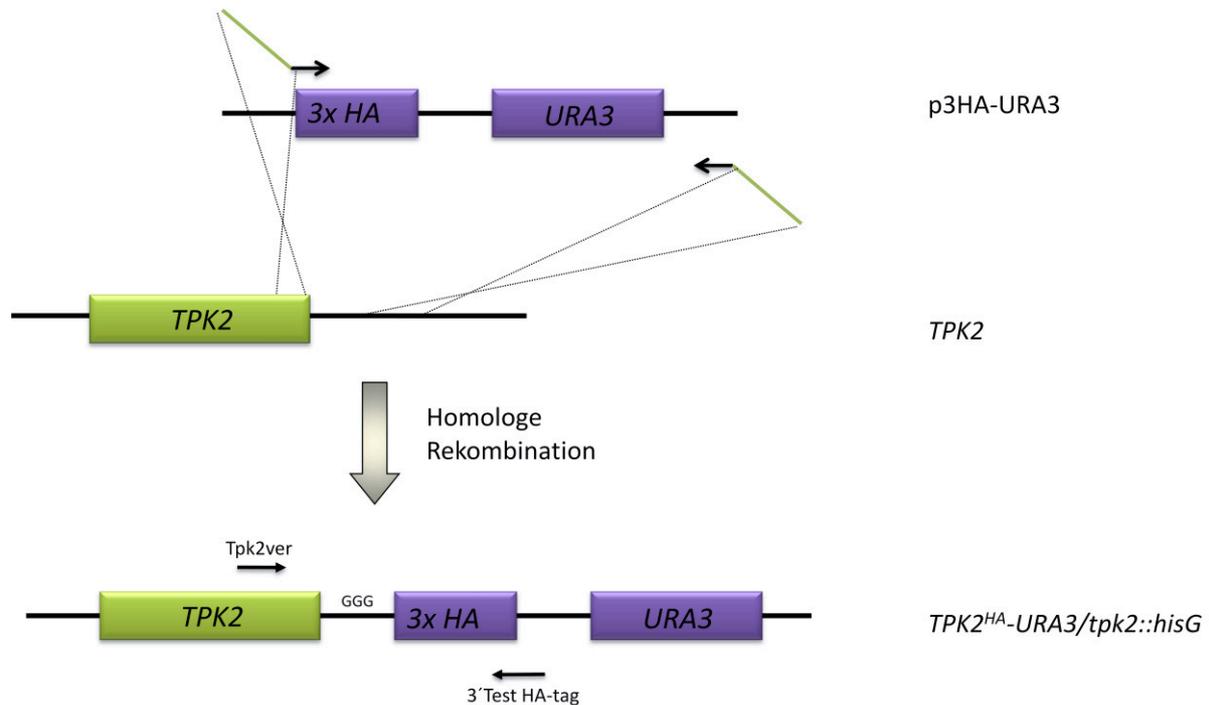


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der HA-Epitop-Markierung. Exemplarisch ist die Markierung von Tpk2 abgebildet. Die Sequenz des dreifachen HA-Epitops sowie der Selektionsmarker *URA3* wurden von dem Plasmid p3HA-URA3 durch PCR amplifiziert. Die Pfeile im oberen Bild stehen für die verwendeten Primer. Der schwarze Bereich ist homolog zur Plasmidsequenz, während der grüne Bereich die Homologie der Primer zu der genomischen Sequenz von *TPK2* zeigt. Die schwarzen Pfeile im unteren Bild zeigen schematisch die Bindestellen der Primer für die Verifikations-PCR.

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in heterozygote *C. albicans*-Stämme transformiert, in denen nur noch ein Allel für die jeweilige AGC-Kinase vorhanden ist. Die dafür benötigten Stämme FII4a (*TPK1/tpk1 ura3/ura3*) und CAS2 (*Sch9/sch9 ura3/ura3*) tragen eine homozygote *URA3*-Mutation und standen bereits zur Verfügung (Bockmühl *et al.*, 2001; Setiadi, 2006). Der Stamm TPO7 (*TPK2/tpk2 ura3/ura3*) wurde von Sonneborn *et al.* (2000) hergestellt, ist aber verloren gegangen. Daher wurde er aus dem Stamm TPK7 (*TPK2/tpk2 URA3/ura3*), der eine heterozygote *URA3*-Mutation trägt, mit Hilfe der 5-FOA-Selektion (Abschnitt 2.2.6) neu konstruiert. *URA3* ist in diesem Fall von *hisG*-Sequenzen umgeben. 5-FOA wird durch das Genprodukt von *URA3*, die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, zu einem toxischen Produkt gewandelt. Somit konnte der Selektionsmarker durch *hisG*-vermittelte Exzision entfernt werden. Der Stamm wurde als AF1001/TPO7 (*TPK2/tpk2 ura3/ura3*) bezeichnet. Die Epitop-Markierung von Bcy1 fand in dem Wildtypstamm CAI4 statt. In diesen Stamm wurde auch das PCR-Produkt für die Epitop-Markierung von Tpk1 transformiert. Dies war für die weiter unten beschriebenen Funktionalitätsanalysen notwendig (Abschnitt 3.1.2).

Nach der Transformation der PCR-Fragmente erfolgte eine Selektion auf SD-Medium. Durch Kolonie-PCR wurde geprüft, ob die Fragmente erfolgreich integriert worden sind. Hierfür wurden „forward“ Primer TPK1ver, TPK2ver, SCH9ver, BCY1ver verwendet, die im ORF stromaufwärts des Integrationsbereichs der *3xHA-URA3*-Kassette hybridisieren, während der „reverse“ Primer (3' Test HA-tag) komplementär zur *3xHA-URA3*-Sequenz ist. Bei einer korrekten Integration in das Genom wurden daher Fragmente definierter Größe erwartet.

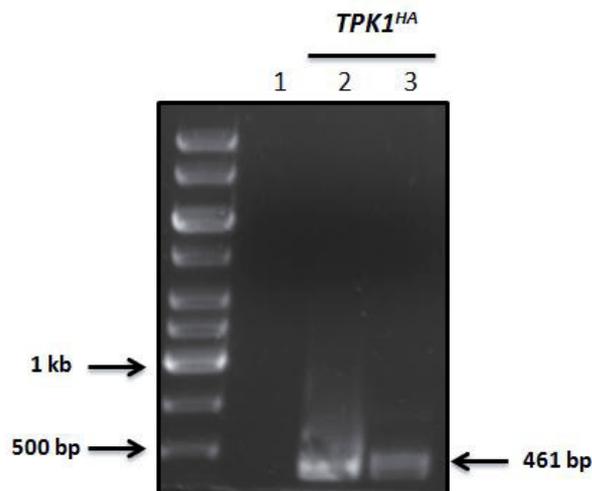


Abb. 3.2 Kolonie-PCR zur Verifikation der HA-Epitop-Markierung von Tpk1. Kolonie-PCR von zwei Stämmen, die das *TPK1-3xHA-URA3*-Fusionsgen enthalten (Spuren 2 und 3). In Spur 1 wurde als Negativkontrolle der Ausgangsstamm FII4a für die Kolonie-PCR benutzt. Es wurden die Primer TPK1ver und 3' Test HA-tag verwendet.

Abb. 3.2 zeigt exemplarisch eine Verifikation der HA-Epitop-Markierung von Tpk1 anhand einer Kolonie-PCR von Transformanten des Stammes FII4a. Durch den Einsatz der Primer TPK1ver und 3' Test HA-tag wurde eine Fragmentgröße von 461 bp erwartet, welche in Spur 2 und 3 zu erkennen ist. Die erwarteten Fragmentgrößen von Tpk2 (621 bp), Sch9 (689 bp) und Bcy1 (502 bp) konnten ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Durch diese Vorgehensweise konnten Stämme konstruiert und verifiziert werden, die jeweils Tpk1, Tpk2, Sch9 oder Bcy1 mit einer HA-Markierung produzieren. Die Stämme und die jeweiligen Genotypen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tab. 3.1: Genotypen der Stämme, in denen AGC-Kinasen mit einem HA-Epitop markiert wurden.

Stamm	Genotyp
AF1003	wie CAI4, aber <i>TPK1^{HA}::URA3/TPK1</i>
AF1004	wie CAI4, aber <i>TPK1^{HA}::URA3/tpk1::hisG</i>
AF1005	wie CAI4, aber <i>TPK2^{HA}::URA3/tpk2::hisG</i>
AF1006	wie CAI4, aber <i>SCH9^{HA}::URA3/sch9::hisG</i>
AF1007	wie CAI4, aber <i>BCY1^{HA}::URA3/BCY1</i>

3.1.1 Produktion der Epitop-markierten AGC-Kinasen

Um zu überprüfen, ob die durch Kolonie-PCR verifizierten Stämme die Epitop-markierten Proteine synthetisieren, wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt (Abschnitt 2.7.4).

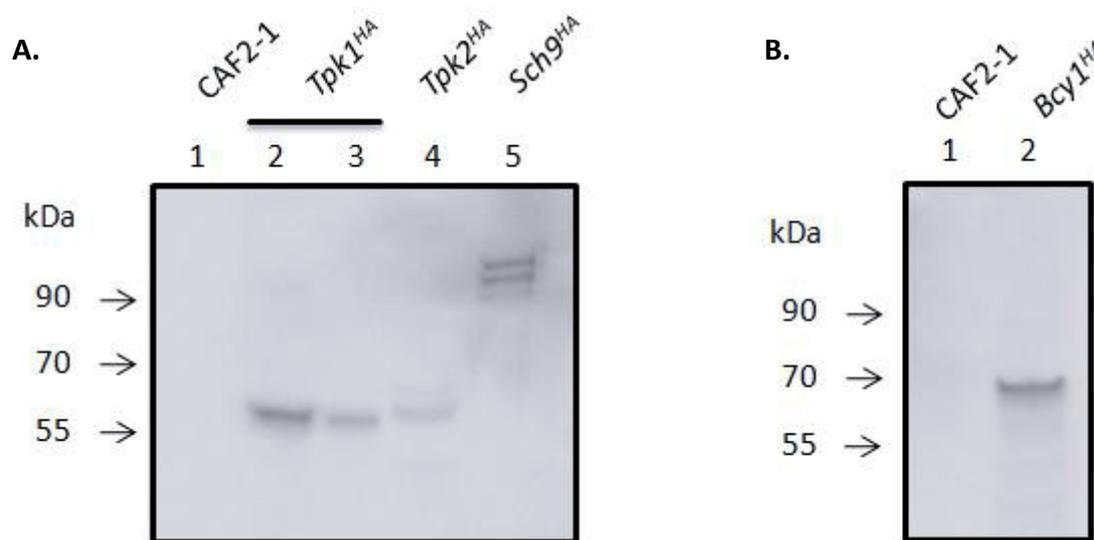


Abb. 3.3: Immunoblot-Analyse der HA-Epitop-Markierung von Tpk1, Tpk2, Sch9 und Bcy1. Die konstruierten Stämme AF1003, AF1004, AF1005, AF1006 (A) sowie AF1007 (B) wurden in YPD auf eine OD_{600} von 0,2 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 bei 30 °C inkubiert. Es wurden Rohextrakte hergestellt und jeweils 50 µg Protein auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:1000 verdünntem Primärantikörper (Anti-HA, aus der Ratte) und dem 1:10000 verdünnten Sekundärantikörper (Anti-Ratte, Peroxidase-konjugiert; Abschnitt 2.7.4). Als Negativkontrolle wurde jeweils in Spur 1 der Rohextrakt des Stammes CAF2-1 (Wildtyp) aufgetragen. Tpk1 wurde in CAI4 (Wildtyp) (Spur 2) und in FII4a (*TPK1/tpk1*) (Spur 3) mit einem HA-Epitop versehen.

Hierfür wurden die konstruierten Stämme in YPD-Medium angezogen, Rohextrakte aus ihnen gewonnen und jeweils 50 µg der Rohextrakte auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, wurde diese mit Anti-HA-Primärantikörper aus der Ratte und anschließend mit dem sekundären, Peroxidasegekoppelten Anti-Ratte-Antikörper inkubiert. Die Signale wurden mit dem Chemilumineszenz-Substrat „SuperSignal® West Dura“ (Pierce) nachgewiesen.

Abb. 3.3 zeigt klare Markerbanden für die HA-markierten Proteine Tpk1, Tpk2 und Bcy1 auf dem Immunoblot. Die Negativkontrolle (jeweils Spur 1) weist keine dieser Banden auf. Das vorausgesagte Molekulargewicht der Proteine nach der Markierung mit dem HA-Epitop

beträgt für Tpk1^{HA} 50 kDa, für Tpk2^{HA} 54 kDa, für Sch9^{HA} 92 kDa und 53 kDa für Bcy1^{HA}. Demnach stimmen die errechneten Größen nicht ganz mit dem Laufverhalten der Proteine Tpk1^{HA}, Tpk2^{HA} und Bcy1^{HA} überein, da alle ein größeres Molekulargewicht in dem Immunoblot zeigen. Tpk1^{HA} ist etwa 10 kDa größer als errechnet, Tpk2^{HA} ungefähr 5 kDa und Bcy1^{HA} ist ca. 15 kDa größer. Im Falle von Sch9 wurde eine Doppel- bzw. Dreifachbande beobachtet. Da jedoch alle Proteine eine klar abgegrenzte und spezifische Bande erzeugen und die Negativkontrolle gar keine Banden zeigt, war die Markierung der Proteine erfolgreich. Die Laufunterschiede können auf eventuelle Proteinmodifikationen oder Besonderheiten der Proteinstruktur der AGC-Kinasen zurückgeführt werden. Die Stämme wurden als AF1003 (*TPK1-HA-URA3/TPK1*), AF1004 (*TPK1-HA-URA3/tpk1*), AF1005 (*TPK2-HA-URA3/tpk2*), AF1006 (*SCH9-HA-URA3/sch9*) und AF1007 (*BCY1-HA-URA3/BCY1*) bezeichnet.

3.1.2 Funktionalitätsanalysen der Epitop-markierten Proteine

Nachdem nachgewiesen worden war, dass die Stämme AF1003, AF1004, AF1005, AF1006 und AF1007 AGC-Kinasen fusioniert an das HA-Epitop produzieren, musste getestet werden, ob die Funktionalität der Proteine noch gegeben war.

- Funktionalitätsanalyse von Tpk1^{HA} und Tpk2^{HA}

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Deletion der PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 die Hyphenbildung blockiert. So zeigt die heterozygote (*TPK1/tpk1*) sowie die homozygote (*tpk1/tpk1*) *tpk1*-Mutante einen Verlust der Hyphenbildung (Bockmühl *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu ist die heterozygote *tpk2*-Mutante noch fähig, Hyphen zu bilden, während ein Verlust der Hyphenbildung bei einer homozygoten *tpk2*-Mutante zu beobachten ist (Sonneborn *et al.*, 2000). Die Funktionalität von Tpk1^{HA} und Tpk2^{HA} konnte somit anhand der Hyphenbildung getestet werden, indem Vereinzlungsausstriche der konstruierten Stämme AF1003 (*TPK1-HA-URA3/TPK1*), AF1004 (*TPK1-HA-URA3/tpk1*) und AF1005 (*TPK2-HA-URA3/tpk2*) auf Hypheninduktionsmedium (Spider-Agar) für 3 Tage bei 37 °C inkubiert wurden. Die Hyphenbildung der Stämme wurde mit dem Wildtypstamm und den hetero- sowie den homozygoten *tpk1*- bzw. *tpk2*-Mutanten verglichen.

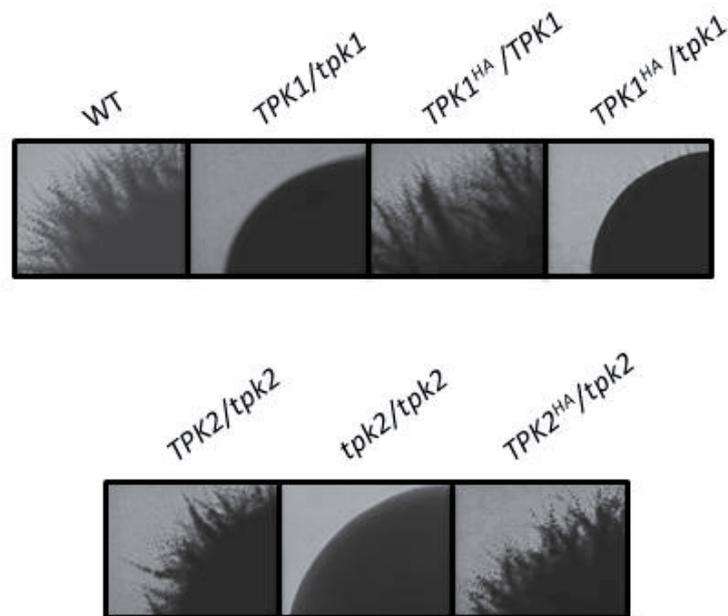


Abb. 3.4: Funktionalitätstest von Tpk1^{HA} und Tpk2^{HA}. Die zu testenden Stämme CAF2-1 (WT), II (*TPK1/tpk1*), TPK7 (*TPK2/tpk2*), TPO7.4 (*tpk2/tpk2*), AF1003 (*TPK1^{HA}/TPK1*), AF1004 (*TPK1^{HA}/tpk1*) und AF1005 (*TPK2^{HA}/tpk2*) wurden auf Hypheninduktionsmedium (Spider-Agar) ausgestrichen. Nach 3 Tagen bei 37 °C wurde die Hyphenbildung der Einzelkolonien überprüft.

Abb. 3.4 zeigt, dass der Wildtypstamm CAF2-1 in der Lage ist, Hyphen zu bilden. Die Deletion eines Allels von *TPK2* führt zu keinem Verlust des Phänotyps. Erst bei vollständiger Disruption des Gens konnten die Kolonien keine Hyphen mehr ausbilden. Im Gegensatz dazu war bereits die heterozygote *tpk1*-Mutante (Stamm II) nicht mehr in Lage Hyphen auszubilden.

Wurde Tpk1 in einem heterozygoten Hintergrundstamm mit einem HA-Epitop markiert (*TPK1^{HA}/tpk1*), bildete dieser Stamm (AF1004) keine Hyphen (Abb. 3.4). Da unklar war, ob der Verlust der Hyphenbildung durch das Fehlen eines Allels von *TPK1* oder durch die HA-Epitop-Markierung zu Stande kam, wurde auch Stamm AF1003 untersucht, in dem Tpk1 mit einem HA-Epitop im Wildtypstamm CAI4 versehen wurde (*TPK1^{HA}/TPK1*). Dieser Stamm konnte wie der Wildtyp Hyphen bilden, was die Funktionalität der Tpk1-HA-Fusion beweist. Ebenso ist das Tpk2-HA-Fusionsprotein funktionell, da der Stamm AF1005 (*TPK2^{HA}/tpk2*) in der Lage ist Hyphen auszubilden.

- Funktionalitätsanalyse von Bcy1^{HA}

Das Bcy1-Protein ist die regulatorische Untereinheit der PKA. In Stamm AF1007 (*BCY1^{HA}/BCY1*) ist dieses Protein mit einem HA-Epitop markiert. Hetero- und homozygote *bcy1*-Mutanten zeigen einen Vitalitätsverlust nach einem zweistündigen Hitzeschock bei 50 °C (Giacometti *et al.*, 2009). Um die Funktionalität des HA-markierten Bcy1-Proteins in Stamm AF1007 zu überprüfen, wurden die zu testenden Stämme auf einer YPD-Platte ausgestrichen, für zwei Stunden bei 50 °C und anschließend bei 30 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde dieser Wachstumsversuch ohne Hitzeschock durchgeführt. Das Wachstum der Stämme wurde nach zwei Tagen kontrolliert (Abb. 3.5)

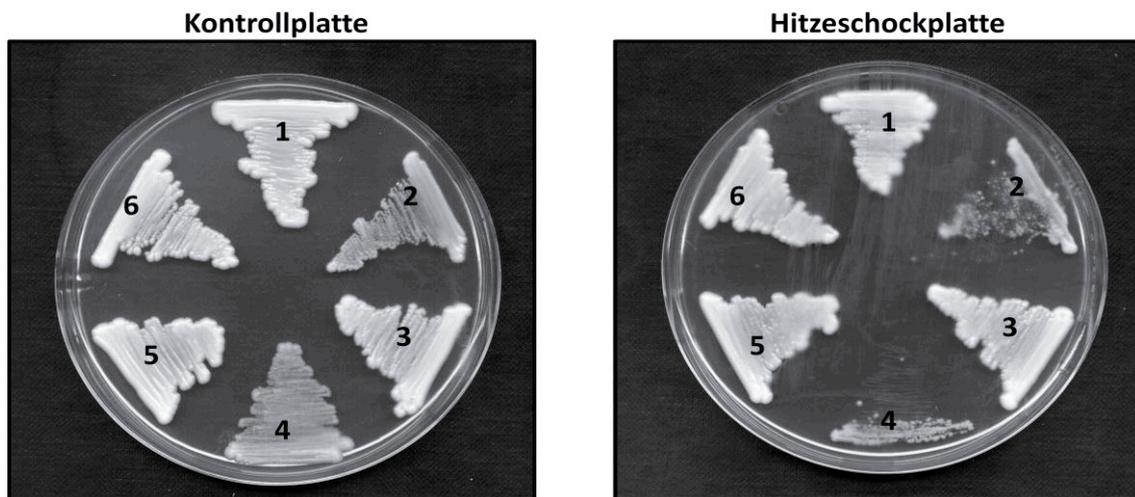


Abb. 3.5: Funktionalitätstest von Bcy1^{HA}. Die zu untersuchenden Stämme wurden in folgender Reihenfolge auf 2 YPD-Platten ausgestrichen: 1. CAF2-1 (WT), 2. CAI4* (WT), 3. AF1007 (*BCY1^{HA}/BCY1*), 4. LG082* (*tpk2/tpk2 bcy1/bcy1*), 5. TPO7.4 (*tpk2/tpk2*) und 6. AS1* (*tpk2/tpk2*). Die Kontrollplatte wurde direkt bei 30 °C inkubiert; die Hitzeschockplatte hingegen wurde vorher für 2 Stunden auf 50 °C gehalten und dann ebenfalls bei 30 °C inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das Wachstum der Stämme beobachtet. * = Stämme mit *ura3/ura3*-Genotyp.

Der Wildtypstamm CAF2-1 überlebt einen zweistündigen Hitzeschock (Abb. 3.5; Stamm 1) im Gegensatz zu einer homozygoten *tpk2 bcy1* - Doppelmutante (Abb. 3.5; Stamm 4). Nur eine gleichzeitige Deletion beider Gene (*TPK2* und *BCY1*) führt zu diesem Phänotypen, da eine homozygote *tpk2*-Mutante (Stamm 5) fähig ist, einen Hitzeschock zu überstehen. Die Funktion von Bcy1^{HA} in AF1007 (*BCY1^{HA}/BCY1*, Stamm 3) ist gegeben, da dieser Stamm den Hitzeschock überlebte. Bei einem Funktionalitätsverlust wäre ein Wachstumsdefekt nach einem Hitzeschock zu beobachten, da bereits eine heterozygote *bcy1*-Mutante nicht in der Lage ist, einen Hitzeschock zu überstehen (Giacometti *et al.*, 2009).

- Funktionalitätsanalyse von Sch9^{HA}

Um die Funktionalität des Epitop-markierten Sch9-Proteins zu testen wurde die Hyphenbildung der Stämme unter speziellen Hypheninduktionsbedingungen beobachtet. In früheren Arbeiten wurde festgestellt, dass eine homozygote *sch9*-Mutante unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂), erhöhten CO₂-Konzentrationen (6 %) und 25 °C auf YPS-Agar einen hyperfilamentösen Phänotypen zeigt (Stichternoth, 2009). Weiterhin beobachtete Stichternoth (2009), dass die *sch9*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Koloniegröße aufweist. Koloniegröße und Hyphenbildung des Wildtyps, der hetero- und homozygoten *sch9*-Mutanten sowie des neu konstruierten Stammes AF1006 (*Sch9^{HA}/sch9*) wurden untersucht. Die Stämme wurden auf YPS-Agar vereinzelt und für 3 Tage unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂) und 6 % CO₂ bei 25 °C inkubiert.

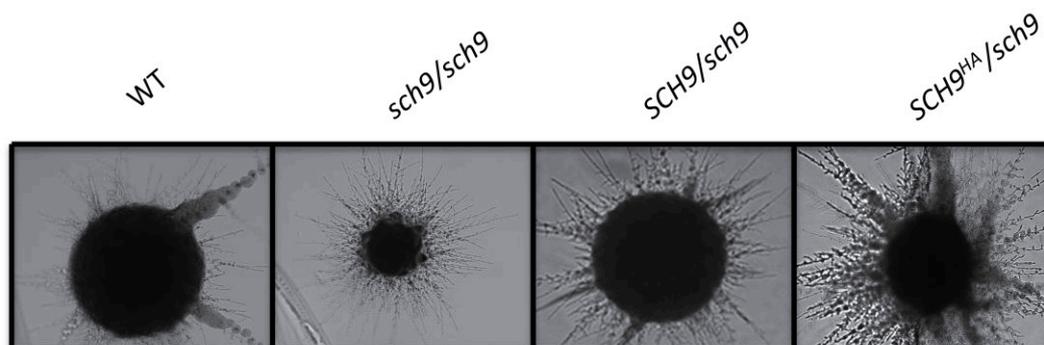


Abb. 3.6: Funktionalitätstest von Sch9^{HA}. Die zu testenden Stämme CAF2-1 (WT), CCS3 (*sch9/sch9*), CAS1 (*SCH9/sch9*) und AF1006 (*SCH9^{HA}/sch9*) wurden auf YPS-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden 3 Tage bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C inkubiert.

In Abb. 3.6 ist zu erkennen, dass der Wildtypstamm CAF2-1 unter Hypoxie (0,2 % O₂) und erhöhtem CO₂-Level bei 25 °C nur wenige Hyphen ausbildet. Die homozygote *sch9*-Mutante CCS3 (*sch9/sch9*) zeigt dagegen den beschriebenen hyperfilamentösen Phänotypen (Stichternoth, 2009) und die Kolonien der *sch9*-Mutante sind im Vergleich zum Wildtypstamm kleiner. Bei der heterozygoten *sch9*-Mutante kommt es zwar auch zur verstärkten Ausbildung von Hyphen, ihre Koloniegröße ähnelt aber dem Wildtypstamm. Da der Stamm AF1006 (*Sch9^{HA}/sch9*) denselben Phänotypen wie die heterozygote *sch9*-Mutante (CAS1) zeigt, kann von der Funktionalität des HA-markierten Sch9-Proteins ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die C-terminale Fusion von HA-Epitopen an die untersuchten AGC-Kinasen die Funktionalität der Proteine nicht beeinträchtigt.

3.2 Zelluläre Lokalisation der AGC-Kinasen

Die zelluläre Lokalisation von AGC-Kinasen in Pilzen ist sehr unterschiedlich. Während die PKA beispielsweise in *S. cerevisiae* im Nukleus zu finden ist, ist sie in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* im Cytoplasma lokalisiert (Griffioen *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2008). Sch9 aus *S. cerevisiae* ist an der vakuolären Membran lokalisiert, hat aber auch eine Funktion im Zellkern, da das Protein Chromatin-assoziiert ist (Jorgensen *et al.*, 2004; Pascual-Ahuir und Proft, 2007).

Die zelluläre Lokalisation der HA-Epitop-markierten AGC-Kinasen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Stämme CAF2-1, AF1004 (Tpk1^{HA}), AF1005 (Tpk2^{HA}), AF1006 (Sch9^{HA}) und AF1007 (Bcy1^{HA}) wurden dazu unter Hefewachstums- sowie Hypheninduktionsbedingungen angezogen. Unter Hefewachstumsbedingungen wurden die Zellen in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Für die Induktion von Hyphen wurde zunächst YP-Medium bei 37 °C vortemperiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert. Die Hypheninduktion erfolgte anschließend durch die Zugabe von Pferdeserum (Endkonzentration 10 %) und Inkubation bei 37 °C für 30 min. Diese Wachstumsbedingungen wurden auch in späteren Analysen (Abschnitt 3.3) verwendet.

Die Zellen wurden auf Objektträgern fixiert und die Proteine mit Anti-HA-Primärantikörper aus der Ratte und anschließend mit dem sekundären, FITC-gekoppelten Anti-Ratte-Antikörper inkubiert. Vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Präparate mit „Antifade“ behandelt, um einen Verlust der Fluoreszenz („Photobleichung“) zu verhindern. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt.

Das Wachstum von *C. albicans* in der Hefeform führte zu einer gleichmässigen Verteilung von Tpk1, Sch9 und Bcy1 in der Zelle. Tpk2 zeigte einige Akkumulationen am Rande der Zellkernhülle (gelbe Punkte). Bei Induktion des Hyphenwachstums schienen die Kinasen Tpk1, Tpk2 und Sch9 nicht nur im Zytoplasma, sondern auch an der Zytoplasmamembran lokalisiert zu sein. Bcy1 blieb jedoch weiterhin größtenteils im Zytoplasma. Daher sind die untersuchten AGC-Kinasen unter allen Wachstumsbedingungen größtenteils im Zytoplasma der Zelle lokalisiert, ein kleiner Anteil der Proteine könnte sich aber im Zellkern befinden.

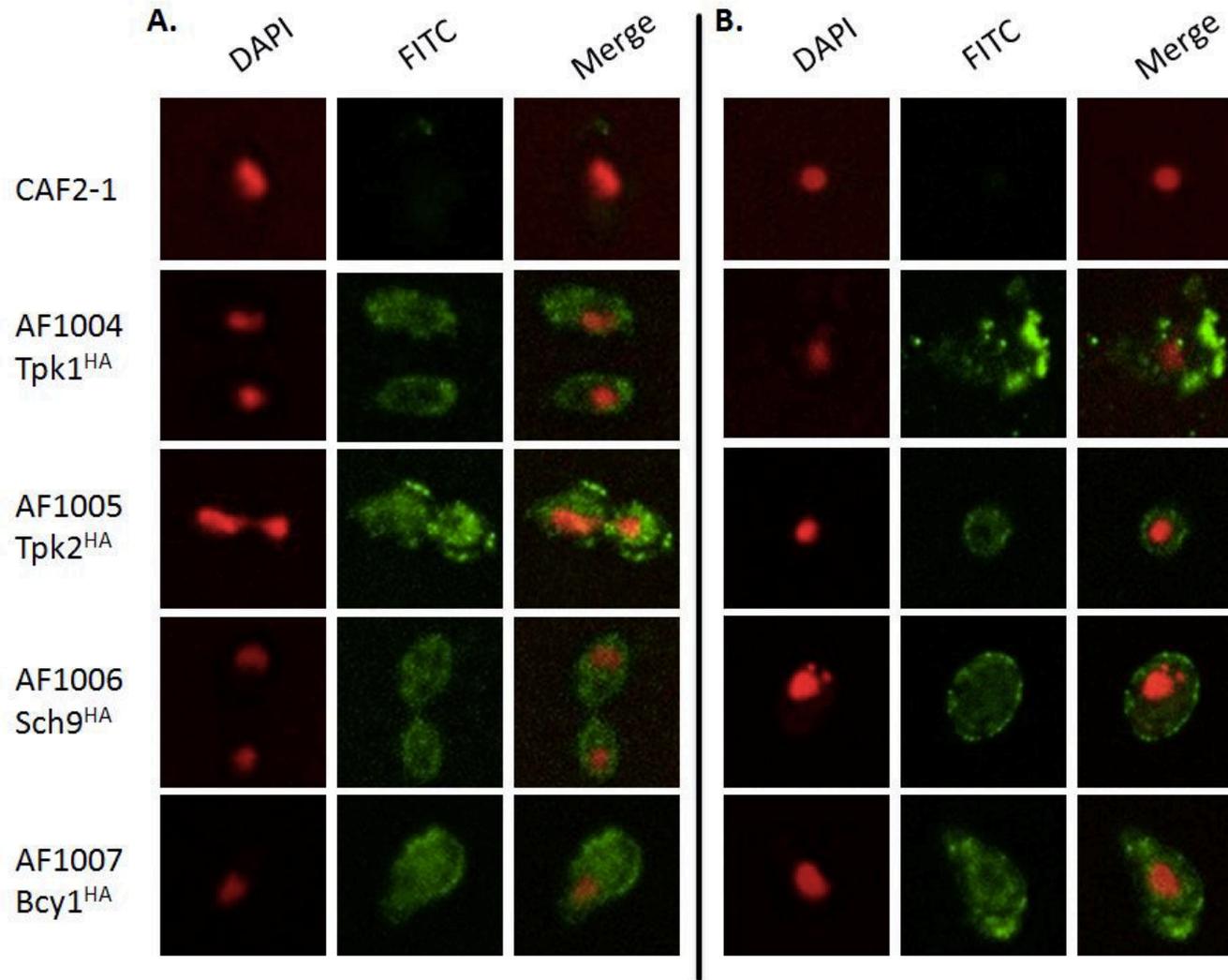


Abb. 3.7: Immunfluoreszenz von Tpk1, Tpk2, Sch9 und Bcy1. Gezeigt sind die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie der Stämme CAF2-1, AF1004 (Tpk1^{HA}), AF1005 (Tpk2^{HA}), AF1006 (Sch9^{HA}) und AF1007 (Bcy1^{HA}) unter Hefewachstums- (A) und Hypheninduktionsbedingungen (B). Die Detektion erfolgte mit einem primären Anti-HA-Antikörper (aus der Ratte) und einem FITC-gekoppelten Sekundäntikörper (Anti-Ratte). Das DAPI-Signal ist in rot, das FITC-Signal in grün dargestellt. Merge = Überlappung der Signale.

3.3 Chromosomale Lokalisation der AGC-Kinasen

PKA-Isoformen sind bei *S. cerevisiae* teilweise in der Nähe ihrer Zielgene im Genom lokalisiert (Pokholok *et al.*, 2006). Daher sollte in diesem Teil der Arbeit nach genomischen Binderegionen der PKA-Isoformen Tpk1, Tpk2 und ihrer regulatorischen Untereinheit Bcy1 sowie nach genomischen Binderegionen für die B-Typ Kinase Sch9 gesucht werden. Hierbei wurde die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)-chip-Methode verwendet, durch die in früheren Arbeiten bereits Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Efg1 auf dem gesamten Genom von *C. albicans* identifiziert werden konnten (Lassak *et al.*, 2011). Efg1 bindet unter Hefewachstumsbedingungen an seinen eigenen Promotor, 30 min nach Hypheninduktion dissoziiert das Protein vom Promotorbereich. Da vermutet wird, dass die Proteinkinase A-Isoformen Tpk1 und Tpk2 die Hyphenmorphogenese durch Phosphorylierung von Efg1 aktivieren, ist es möglich, dass die Kinasen in der Nähe des *EFG1*-Promotors binden, um eine schnelle Phosphorylierung von Efg1 zu ermöglichen.

3.3.1 ChIP-chip-Analysen zur Bindung der PKA unter Hefewachstumsbedingungen

Für die ChIP-chip-Analyse der PKA-Isoformen unter Hefewachstumsbedingungen wurden die konstruierten Stämme AF1004 und AF1005 verwendet, die HA-markiertes Tpk1 bzw. Tpk2 produzieren. Die Stämme II (*TPK1/tpk1*) bzw. TPK7 (*TPK2/tpk2*) wurden jeweils als Kontrollen parallel angezogen und synthetisieren die unmarkierten Proteine. Alle Stämme wurden in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Zur Fixierung der Protein-DNA- und Protein-Protein-Verbindungen wurde Formaldehyd verwendet. Die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde wie in Abschnitt 2.7.5 erwähnt durchgeführt. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate angefertigt. Die angereicherten Chromatinfragmente wurden von der Firma Source BioScience (Berlin) fluoreszenzmarkiert, wobei die DNA der Kontrollstämme mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 und die DNA der HA-markierten Stämme mit Cy5 markiert wurde. Anschließend erfolgte die Kohybridisierung auf einem „Whole Genome Tiling Array“ (NimbleGen). Auf diesem Array befinden sich insgesamt 381308 Oligonukleotidsequenzen, die das gesamte Genom von *C. albicans* abdecken. Die Sequenzlänge betrug durchschnittlich 58 bp, wobei der Abstand zwischen den Nukleotiden im Mittel bei 36 bp lag und es zu einer Überlappung der benachbarten Oligonukleotidsequenzen kommt.

Für jedes Oligonukleotid des Arrays entstand ein Hybridisierungssignal, welches das Verhältnis von Immunpräzipitat (IP)-Probe zu Kontroll-Probe darstellt und als „log₂-ratio“ bezeichnet wird. Um die grundsätzliche Differenz der Farbstoffintensität auszugleichen wurde ein „bi-weight-Mittelwert“ aus allen log₂-ratios des Arrays ermittelt. Indem dieser Wert von jedem log₂-ratio-Wert abgezogen wurde, entstanden die „scaled log₂-ratios“. Diese Signale wurden mit dem Programm SignalMap (Version 1.9) visualisiert. Überschritten innerhalb eines 500 bp-Fensters vier der Signale einen Schwellenwert („cutoff-value“), galt dieser Bereich als Binderegion des untersuchten Proteins. Diese Regionen wurden als farblich kodierte Peaks dargestellt, deren Wert („score“) als log₂-ratio des vierthöchsten Signals definiert ist. Die Kodierung beruht auf den FDR (false discovery rate)-Werten der Peaks, wodurch Aussagen über die Signifikanz der Binderegion gemacht werden können. Je kleiner der FDR-Wert ist, desto wahrscheinlicher ist eine Bindung in dem Bereich des Peaks. Rote Peaks stellen eine signifikante Binderegion dar, da sie einen kleinen FDR-Wert ($\leq 0,05$) besitzen. Die FDR-Werte von orangenen ($FDR \leq 0,1$) und gelben ($FDR 0,1 - 0,2$) Peaks deuten auf weniger signifikante Bindestellen hin. Hat ein Peak einen FDR-Wert von $> 0,2$ stellt er eine unwahrscheinliche Binderegionen dar und wird grau gekennzeichnet. Bei der Analyse der Daten wurde der Fokus lediglich auf die roten Peaks gelegt, wobei nur die Binderegionen ausgewertet wurden, die in beiden Replikaten übereinstimmten bzw. überlappten.

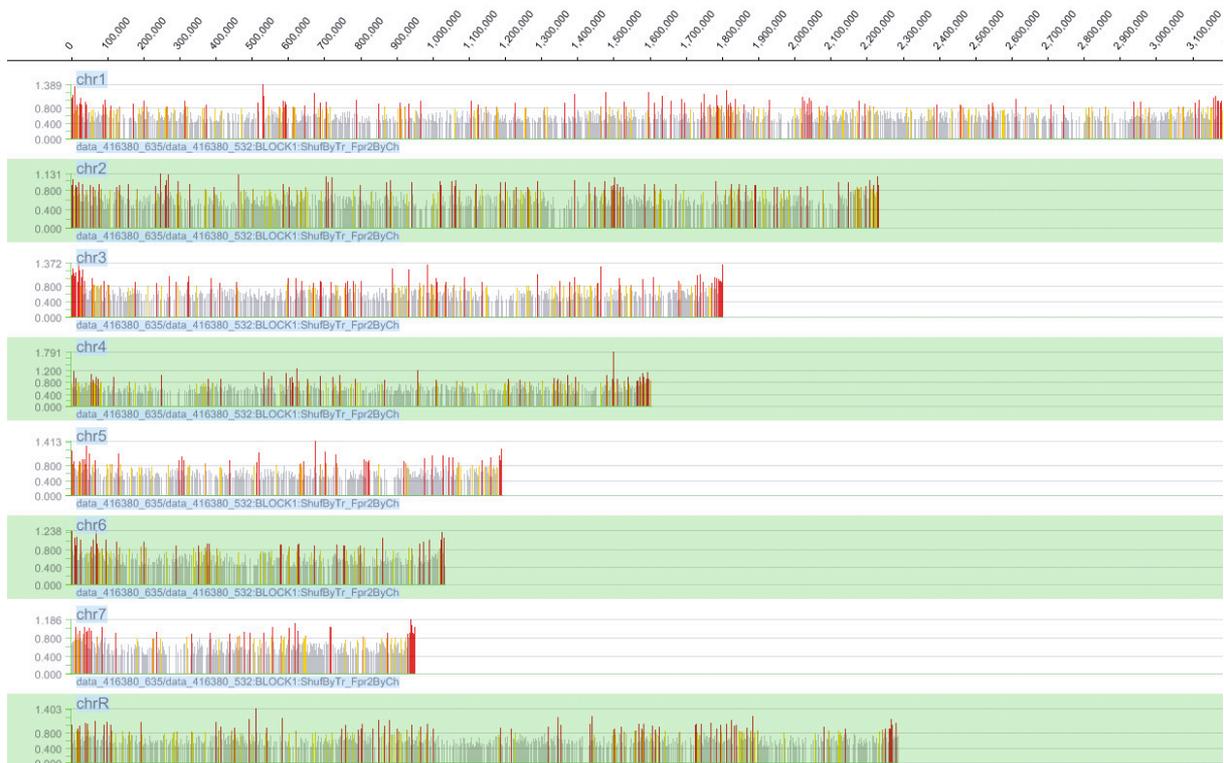


Abb. 3.8: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Tpk1 unter Hefewachstumsbedingungen. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Der Stamm AF1004 ($TPK1^{HA}/tpk1$) und der Kontrollstamm II ($TPK1/tpk1$) wurden in jeweils 50 ml YPD angezogen und bis zu einer OD_{600} von 1 bei 30 °C inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen mit Formaldehyd wurde das Chromatin durch Sonifikation fragmentiert. Durch Verwendung von Anti-HA-Antikörpern (aus der Ratte; Roche) wurden die Proben immunpräzipitiert. Nach Vervielfältigung der Chromatinfragmente wurden die Proben mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und gemeinsam auf einem „Whole Genome Tiling Array“ (NimbleGen) hybridisiert. Die Fluoreszenzsignale wurden für jedes Oligonukleotid ermittelt und mit der Hintergrundfluoreszenz abgeglichen. Letztere konnte mit Hilfe des Kontrollstamms (II) gemessen werden. Signale sind als Peaks dargestellt und zeigen Binderegionen des untersuchten Proteins. Die Peaks wurden farblich kodiert und definieren die Signifikanz der Binderegion. Rote Peaks stellen wahrscheinliche Binderegionen dar, orangefarbene und gelbe Peaks hingegen zeigen weniger wahrscheinliche Binderegionen. Graue Peaks stehen für unwahrscheinliche Binderegionen. Zu sehen sind die Binderegionen von Tpk1 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans*.

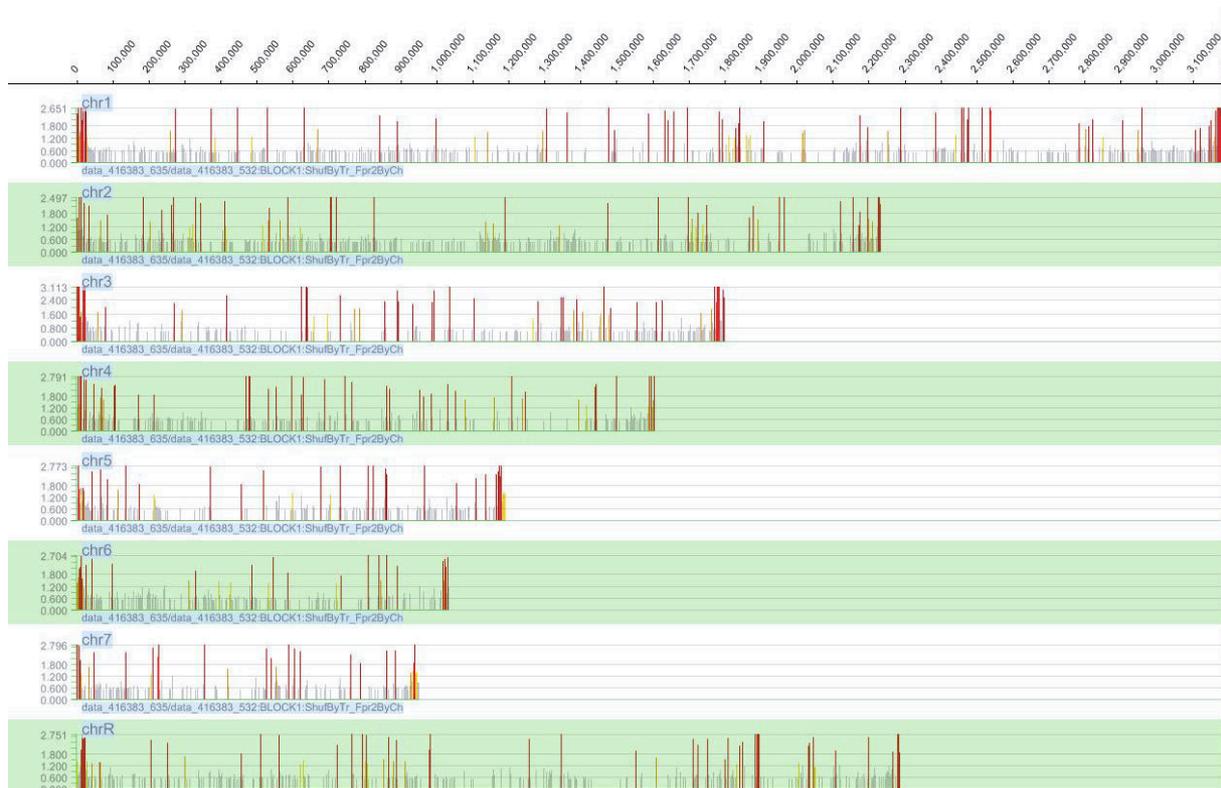


Abb. 3.9: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Tpk2 unter Hefewachstumsbedingungen. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Der Stamm AF1005 ($TPK2^{HA}/tpk2$) und der Kontrollstamm TPK7 ($TPK2/tpk2$) wurden in jeweils 50 ml YPD angezogen und bis zu einer OD_{600} von 1 bei 30 °C inkubiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. Zu sehen sind die Binderegionen von Tpk2 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans*.

Aus Abb. 3.8 wird deutlich, dass es möglich war, genomweite Bindestellen für Tpk1 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans* zu identifizieren. Hierbei fiel jedoch auf, dass viele insignifikante, graue Peaks vorhanden waren. Weiterhin scheint Tpk1 keine Hauptzielregionen im Genom von *C. albicans* zu haben, da die Peaks gleichmäßig verteilt sind und nur an wenigen Stellen akkumulieren. Bei der Auswertung der beiden unabhängigen Replikate konnten lediglich 24 reproduzierbare Binderegionen ermittelt werden (siehe Anhang, Tabelle 9.1).

Bei der Analyse des Datensatzes von Tpk2 kam es im Gegensatz zu Tpk1 zu vielen distinkten, roten Peaks, die über das gesamte Genom verteilt sind (Abb. 3.9). Auffällig ist, dass an jedem Chromosom Binderegionen an den Telomeren erscheinen. Dies war auch teilweise bei Tpk1 zu sehen, jedoch scheinen diese Regionen eher signifikante Binderegionen von Tpk2 zu sein. Insgesamt konnten bei der Auswertung der Replikate 211 Bindestellen für Tpk2 im Genom von *C. albicans* identifiziert werden (siehe Anhang, Tabelle 9.2).

Bei *C. albicans* besteht das PKA-Holoenzym aus einer katalytischen (Tpk1 oder Tpk2) sowie einer regulatorischen Untereinheit (Bcy1). Daher wurde auch für Bcy1 eine ChIP-chip-Analyse durchgeführt (siehe Anhang, Abb. 9.1). In zwei biologischen Replikaten konnten für das Protein dadurch 83 reproduzierbare Bindestellen identifiziert werden (siehe Anhang, Tabelle 9.3).

3.3.1.1 Genomweite Zielsequenzen von Tpk1, Tpk2 und der regulatorischen Untereinheit Bcy1

Nachdem die Binderegionen der jeweiligen Replikate analysiert worden waren, wurden nun unter Zuhilfenahme der *Candida*-Genom-Datenbank (CGD; www.candidagenome.org) die potentiellen Zielgene der PKA-Isoformen ermittelt. Es wurde geprüft, welche ORFs sich in der Nähe bzw. innerhalb der Binderegionen befinden, wobei auf die Orientierung der Gene geachtet wurde. Mit wenigen Ausnahmen wurden die Zielgene wie folgt bestimmt: War eine Binderegion innerhalb eines ORFs zu finden oder lag die Binderegion im 5'-Bereich eines ORFs, wurde dieser ORF als potentielles Zielgen definiert. Waren mehreren ORFs innerhalb einer Binderegion lokalisiert, wurden alle ORFs als potentielle Zielgene gesehen. Falls eine Binderegion zwischen zwei divergent orientierten Genen lag, wurden beide Gene als Zielgene angesehen. So konnten aus den 24 Binderegionen für Tpk1 aus der ChIP-chip-Analyse 42 mögliche Zielgene ermittelt werden (siehe Anhang, Tabelle 9.1). Im Falle von Tpk2 ergaben sich 291 potentielle Zielgene durch die 211 Binderegionen (siehe Anhang, Tabelle 9.2) Die ChIP-chip-Analyse von Bcy1 ergab 125 Zielgene aus 83 Binderegionen (siehe Anhang, Tabelle 9.3). Die Korrelation der potentiellen Zielgene der Kinasen wurde in einem Venn-Diagramm dargestellt. In Abb. 3.10 sind die Schnittmengen der Gene dargestellt, die von Tpk1, Tpk2 und Bcy1 gebunden werden. Tpk1, Tpk2 und Bcy1 haben drei gemeinsame Zielgene, welche noch nicht charakterisiert wurden und an einer Stelle auf Chromosom 1 (Chr1) lokalisiert sind (Telomer). 17 der 42 Zielgene von Tpk1 sind ebenfalls Zielgene von Tpk2, wobei viele dieser ORFs ebenfalls noch nicht charakterisiert sind. Das gemeinsame Zielgen *DAL1* kodiert beispielsweise für eine mögliche Allantoinase, dessen Transkription von Nrg1 und Mig1 reguliert wird (Murad *et al.*, 2001b). *BNR1* kodiert für ein Formin, welches wahrscheinlich die Polarität des Zytoskeletts von Hyphen steuert (Li *et al.*, 2005). Tpk2 und Bcy1 teilen 11 gemeinsame Zielgene. Ein gemeinsames Zielgen ist *ZCF31*, welches für einen

Transkriptionsfaktor kodiert. Dessen Rolle in der Adhärenz von *C. albicans* wurde erst kürzlich gezeigt (Finkel *et al.*, 2012).

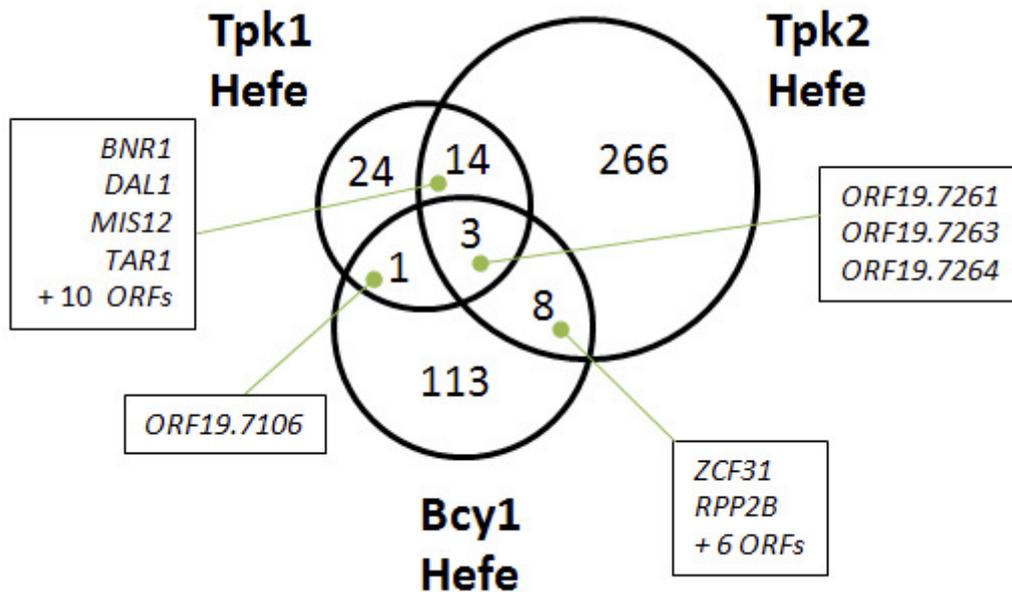


Abb. 3.10: Gemeinsame Zielgene von Tpk1, Tpk2 und Bcy1 unter Hefewachstumsbedingungen. Anhand der CHIP-chip-Analyse wurden Zielgene von Tpk1, Tpk2 und Bcy1 ermittelt und überlappende Gene identifiziert.

3.3.1.2 Bindung von Tpk2 an den *EFG1*-ORF

Durch CHIP-chip-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass das Efg1-Protein unter Hefewachstumsbedingungen an seinen eigenen Promotor bindet. Die Bindung des Proteins erfolgt an mehrere Regionen, wobei es zwei Hauptbinderegionen gibt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Efg1-Bindung keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors hat (Lassak *et al.*, 2011). Da Efg1 durch Tpk1 und Tpk2 reguliert wird, wurde angenommen, dass diese Kinasen ebenfalls am *EFG1*-Locus lokalisiert sind.

Promotor und ORF von *EFG1* sind auf Chromosom R (ChrR) lokalisiert (Abb. 3.11). Es konnte keine Bindung von Tpk1 oder Tpk2 innerhalb des Promotorbereiches von *EFG1* beobachtet werden, jedoch kam es innerhalb des ORFs von *EFG1* zu einer Bindung von Tpk2, welche in beiden Replikaten zu sehen ist (Abb. 3.11 B). Da in diesem Bereich rote Peaks dargestellt werden, handelt es sich hierbei um eine signifikante Bindestelle von Tpk2. Für Tpk1 wurde auch ein signifikanter Peak in der ORF-Region von *EFG1* angezeigt, dieser wurde aber nur in einem der Replikate beobachtet.

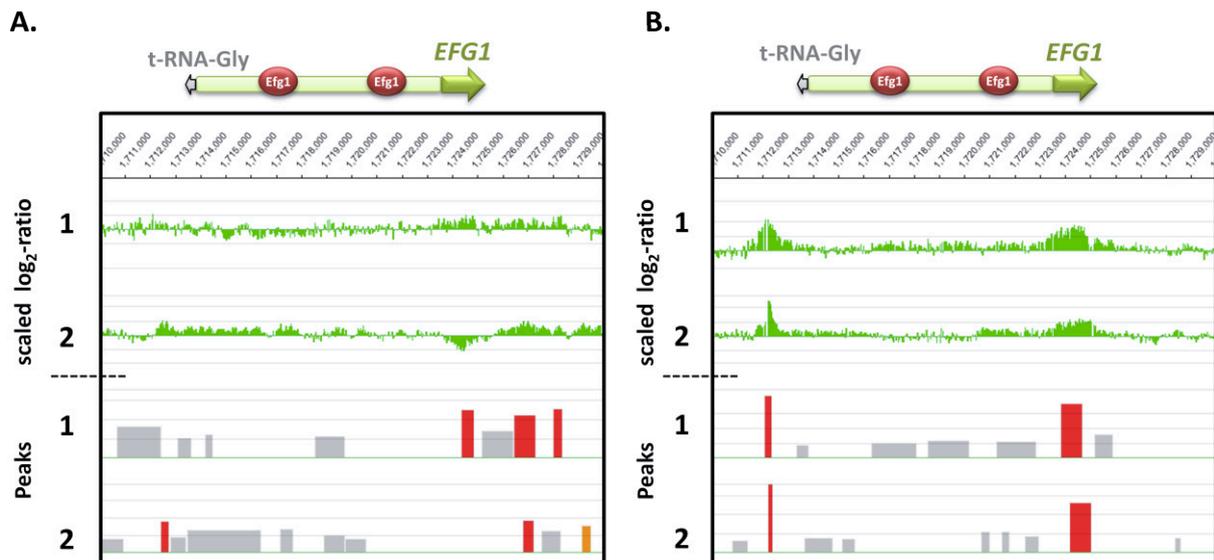


Abb. 3.11: Bindung von Tpk1 und Tpk2 an *EFG1* unter Hefewachstumsbedingungen. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. Im oberen Abschnitt ist der genomische Bereich von Chromosom R, auf welchem *EFG1* lokalisiert ist, abgebildet. Die Positionen von tRNA-Gly und dem ORF von *EFG1* sind durch Pfeile dargestellt. Die Pfeilrichtungen geben die ORF-Orientierung an. Der Promotor-Bereich ist hellgrün unterlegt und zeigt die zwei Hauptzielsequenzen des Efg1-Proteins unter Hefewachstumsbedingungen (Lassak *et al.*, 2011). Die „scaled log₂-ratios“ sowie die farblich kodierten Peaks der Replikate (1 und 2) der ChIP-chip-Analyse von Tpk1 (A) und Tpk2 (B) sind im unteren Abschnitt abgebildet.

3.3.1.3 Identifizierung von PKA-Konsensus-Bindesequenzen unter Hefewachstumsbedingungen

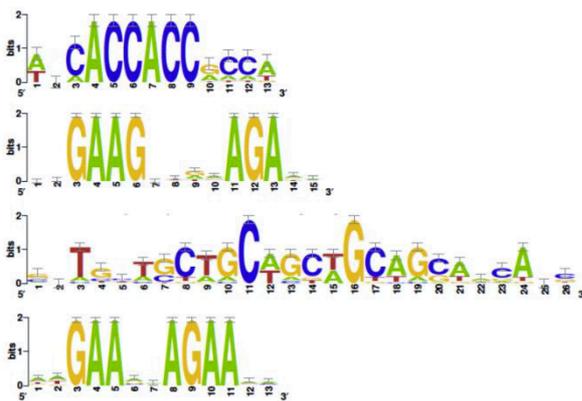
Die ChIP-chip-Methode ermöglicht es, Binderegionen eines Zielproteins zu identifizieren. Dabei werden aber direkte sowie indirekte Bindesequenzen ermittelt, da durch die Behandlung mit Formaldehyd nicht nur die Protein-DNA-, sondern auch Protein-Protein-Interaktionen fixiert werden. So könnten die ermittelten Zielgene eigentlich Zielgene von beispielsweise Transkriptionsfaktoren sein, die mit den Kinasen assoziiert sind. Für die Analyse von gemeinsamen Bindesequenzen wurde das Programm „RSAT dyad-analysis (spaced pairs)“ (<http://rsat.ulb.ac.be/>; van Helden *et al.*, 2000) genutzt. Hiermit wird ein Motiv in Form von „dyads“ innerhalb der eingegebenen DNA-Sequenzen ermittelt. Ein „dyad“ ist eine Monade (Einheit) von ein bis drei Nukleotiden, welche überrepräsentiert ist und durch eine variierende Anzahl von Basen („spaced pairs“) getrennt sein kann (Thomas-Chollier *et al.*, 2008). Durch Konvertierung der dyads zu Nukleotidverteilungs-Matrizen (count matrices bzw. PSSM (position-specific scoring matrices)) werden Konsensus-Bindesequenzen dargestellt. Bei der Analyse zur Ermittlung einer Bindesequenz wurde nach

Monaden aus drei Nukleotiden gesucht, die durch 0 bis 20 Nukleotide voneinander getrennt sein können. Weiterhin beinhaltete die Suche „direct repeats“ (Wiederholung desselben Trinukleotid-Sets) und „inverted repeats“ (Wiederholung des Trinukleotid-Sets oder dessen Komplementärsequenz).

Die Analysen aus den 24 ermittelten Binderegionen von Tpk1 und den 211 Binderegionen von Tpk2 unter Hefewachstumsbedingungen ergaben Konsensus-Bindesequenzen der PKA-Isoformen unter Hefewachstumsbedingungen (Abb. 3.12).

A.

Rang	Sequenz	E-value	p-value
1	accn{0}acc	1.5e-08	3.4e-13
2	aagn{4}aga	1.3e-06	3.0e-11
3	cagn{3}cag	5.0e-05	1.1e-09
4	gaan{3}gaa	1.3e-04	3.0e-09
5	tcan{0}aca	2.0e-04	4.5e-09



B.

Rang	Sequenz	E-value	p-value
1	accn{0}acc	6.7e-88	1.5e-92
2	cacn{0}cac	1.3e-86	2.9e-91
3	agcn{0}agc	1.7e-82	3.8e-87
4	cagn{3}cag	7.7e-78	1.8e-82
5	cagn{0}cag	5.1e-75	1.2e-79

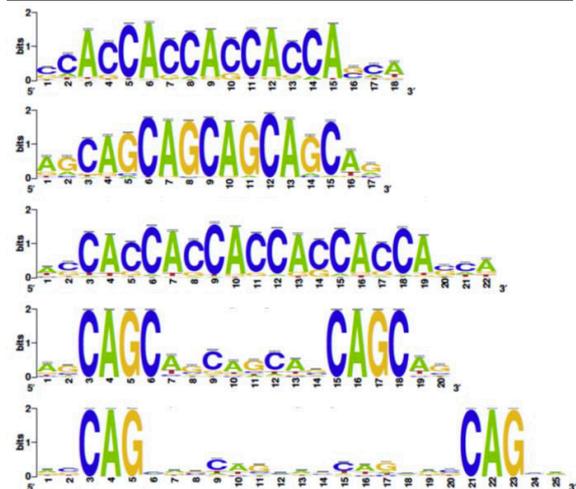


Abb. 3.12: Identifizierung von PKA-Bindemotiven unter Hefewachstumsbedingungen. Mit Hilfe des Programms „RSAT dyad-analysis (spaced pairs)“ (van Helden *et al.*, 2000) wurden PKA-Bindemotive aus den 24 Tpk1- (A) und 211 Tpk2-Bindesequenzen (B) der CHIP-chip-Analyse ermittelt. Es wurde nach überrepräsentierten Monaden (Einheiten) von drei Nukleotiden gesucht („dyads“), die von 0 bis 20 Nukleotiden („spaced pairs“) getrennt aufgefunden werden können. Abgebildet ist jeweils die tabellarische Rangfolge der ermittelten überrepräsentierten „dyads“ und der jeweilige E- bzw. p-value. Die davon abgeleiteten Nukleotidverteilungs-Matrizen sind darunter abgebildet und stellen mögliche Bindemotive der PKA dar.

Besonders signifikante Werte ergaben sich bei der Analyse der Binderegionen von Tpk2. Bei der Analyse der PKA-Bindemotive fiel außerdem auf, dass sich die Bindemotive von Tpk1 und Tpk2 ähneln und alle sehr AG- und AC-reich sind. Dies konnten Lassak *et al.* (2011) auch für die Bindesequenzen des Transkriptionsfaktor Efg1 beobachten.

3.3.2 ChIP-chip-Analysen zur Bindung der PKA-Isoformen unter Hypheninduktionsbedingungen

Durch die ChIP-chip-Analyse konnten Binderegionen der PKA-Isoformen unter Hefewachstumsbedingungen identifiziert werden. Zusätzlich sollte in dieser Arbeit auch analysiert werden, ob sich die Binderegionen unter Hypheninduktionsbedingungen verändern. Für diesen Zweck wurden erneut die Stämme AF1004 (*TPK1^{HA}/tpk1*) und AF1005 (*TPK2^{HA}/tpk2*) sowie die jeweiligen Kontrollstämme II (*TPK1/tpk1*) und TPK7 (*TPK2/tpk2*) verwendet. Für das Experiment wurden 250 ml YP-Medium auf 37 °C vortemperiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert. Die Hypheninduktion erfolgte mit Pferdeserum (Endkonzentration 10 %), wobei die Kulturen bei 37 °C inkubiert wurden. Nach 30 min wurden die DNA-Protein- bzw. die Protein-Protein-Verbindungen mit Formaldehyd fixiert. Die weiteren Schritte waren identisch mit denen unter Hefewachstumsbedingungen (Abschnitt 3.3.1). Es wurden jeweils 2 biologische Replikate angefertigt.

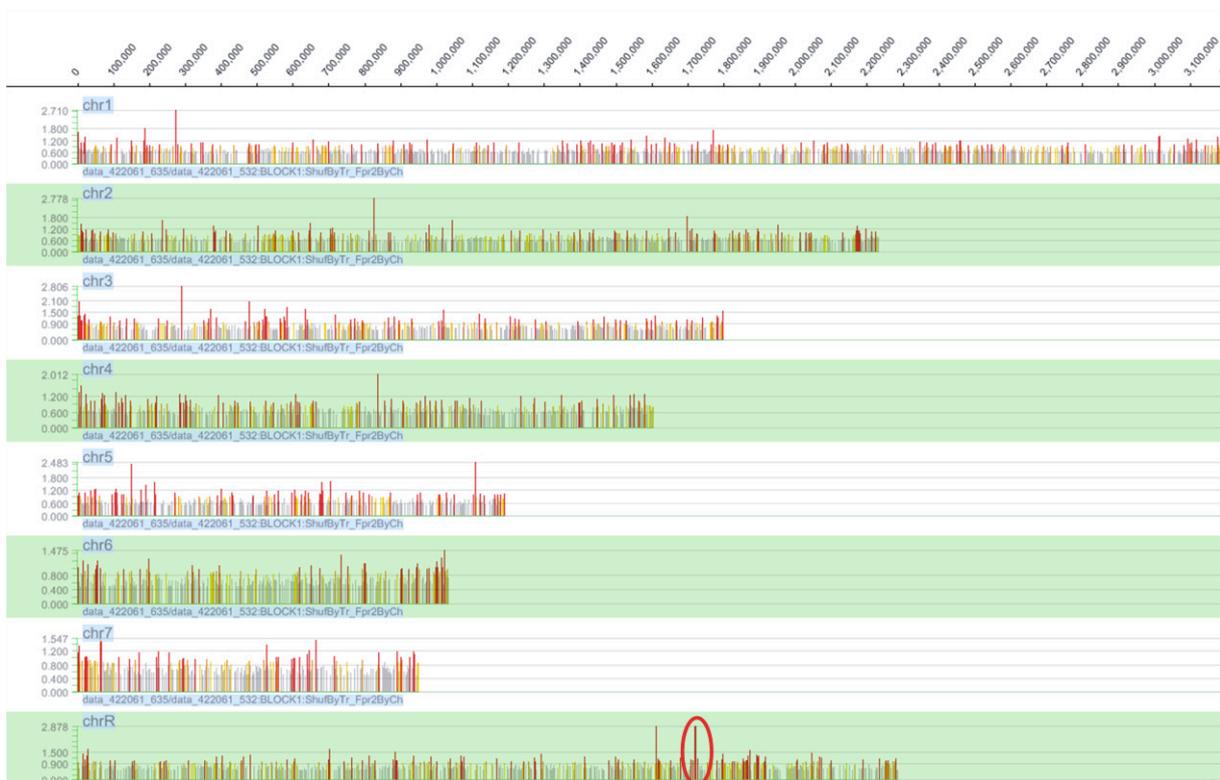


Abb. 3.13: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Tpk1 30 min nach Hypheninduktion. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Der Stamm AF1004 (*TPK1^{HA}/tpk1*) und der Kontrollstamm II (*TPK1/tpk1*) wurden in jeweils 250 ml YP-Medium mit 10 % Pferdeserum bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die nächsten Schritte des Experiments wurden wie unter Hefewachstumsbedingungen durchgeführt (Abb. 3.8). Zu sehen sind die Binderegionen von Tpk1 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans*. Die Position von *EFG1* auf Chromosom R ist rot markiert.

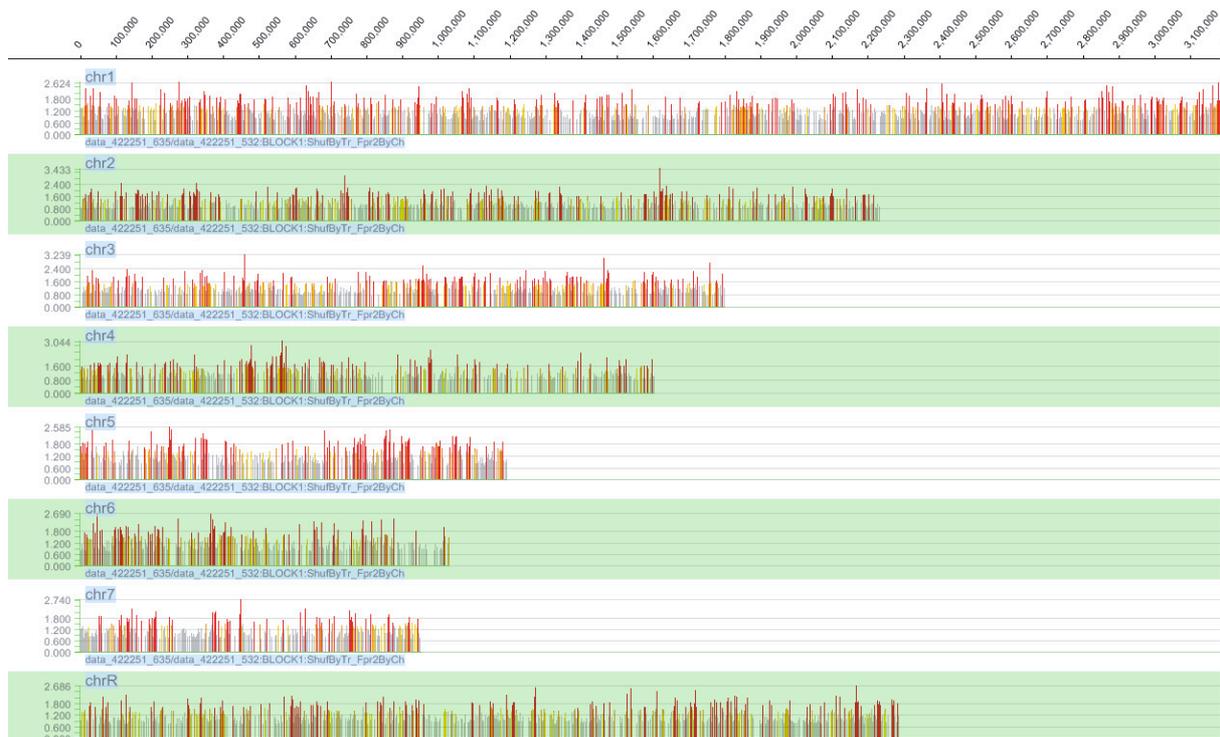


Abb. 3.14: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Tpk2 30 min nach Hypheninduktion. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Der Stamm AF1005 (*TPK2^{HA}/tpk2*) und der Kontrollstamm TPK7 (*TPK2/tpk2*) wurden in jeweils 250 ml YP-Medium mit 10 % Pferdeserum bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die nächsten Schritte des Experiments wurden wie unter Hefewachstumsbedingungen durchgeführt (Abb. 3.8). Zu sehen sind die Binderegionen von Tpk2 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans*.

In Abb. 3.13 ist zu erkennen, dass 30 min nach Induktion der Hyphenbildung Binderegionen von Tpk1 identifiziert werden konnten. Die roten Peaks, welche die Hauptbinderegionen von Tpk1 darstellen, sind distinkter, als die unter Hefewachstumsbedingungen. Insgesamt konnten 38 signifikante Binderegionen ermittelt werden. Bei näherer Betrachtung ist zu erkennen, dass der Bereich von *EFG1* eine der Hauptbinderegionen von Tpk1 ist (scaled \log_2 -ratio: 3,6).

Ebenfalls konnten für die PKA-Isoform Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen 216 Binderegionen definiert werden. In Abb. 3.14 ist dabei zu erkennen, dass die Binderegionen auf allen Chromosomen zu finden sind. Im Gegensatz zu Tpk1 scheint Tpk2 aber unter Hypheninduktionsbedingungen keine Hauptbinderegionen zu besitzen.

3.3.2.1 Genomweite Zielsequenzen von Tpk1 und Tpk2

Wie in Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben, wurden die Binderegionen von Tpk1 und Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen analysiert und mit Hilfe der *Candida*-Genom-Datenbank mögliche Zielgene identifiziert. Für die 38 Binderegionen von Tpk1 konnten 67 Zielgene gefunden werden, während Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen 340 Zielgene besitzt. Tabelle 3.2 zeigt vergleichend die Anzahl der Binderegionen und Zielgene von Tpk1, Tpk2 und Bcy1 unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Tab. 3.2: Binderegionen und Zielgene der PKA unter verschiedenen Bedingungen.

Protein	Wachstumsbedingung	Binderegionen	Gene
Tpk1 ^{HA}	Hefeform	24	42
Tpk1 ^{HA}	Hypheninduktion	38	67
Tpk2 ^{HA}	Hefeform	211	291
Tpk2 ^{HA}	Hypheninduktion	216	340
Bcy1 ^{HA}	Hefeform	83	125

Abgebildet sind die Ergebnisse der ChIP-chip-Analyse unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen.

Die Zielgene von Tpk1 und Tpk2 30 min nach Induktion der Hyphenbildung wurden verglichen und die Schnittmengen in einem Venn-Diagramm abgebildet (Abb. 3.15).

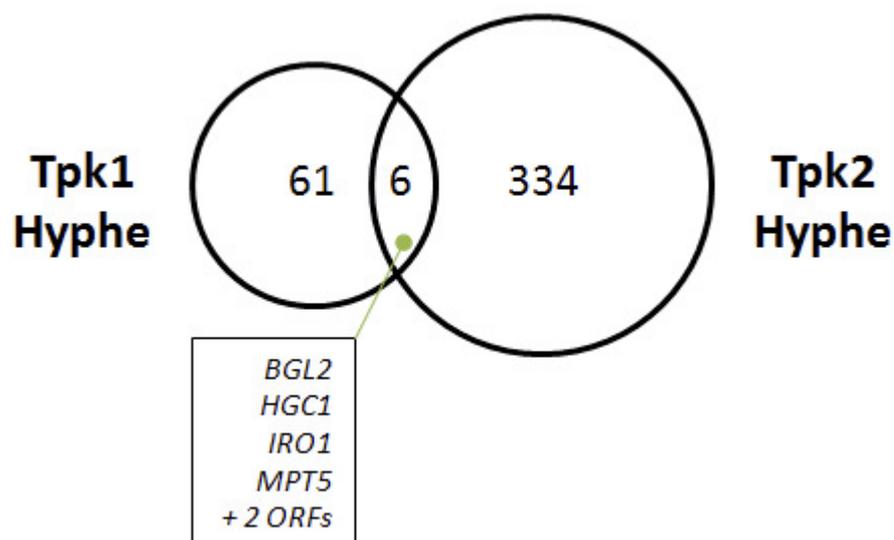


Abb. 3.15: Gemeinsame Zielgene von Tpk1 und Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen. Anhand der ChIP-chip-Analyse wurden Zielgene von Tpk1 und Tpk2 ermittelt und überlappende Gene identifiziert.

Wie unter Hefewachstumsbedingungen konnten auch 30 min nach Hypheninduktion gemeinsame Zielgene von Tpk1 und Tpk2 gefunden werden. Beide Isoformen binden beispielsweise im intergenischen Bereich der divergent orientierten ORFs von *HGC1* und *ORF19.6027*. *HGC1* kodiert für ein hyphenspezifisches G1 Zyklin-ähnliches Protein, welches Einfluss auf die Hyphenmorphogenese hat (Zheng *et al.*, 2004), während *ORF19.6027* einen nicht charakterisierten ORF darstellt.

Der Vergleich der Zielgene von Tpk1 in der Hefe- und Hyphenform zeigt, dass das Protein unter Hypheninduktionsbedingungen gänzlich andere Binderegionen als unter Hefewachstumsbedingungen aufweist. Im Gegensatz dazu konnten für Tpk2 einige Gene identifiziert werden, die unter beiden Bedingungen gebunden werden (Abb. 3.16). Es zeigte sich, dass die PKA-Isoform Tpk2 unter beiden Wachstumsbedingungen deutlich mehr Binderegionen aufweist als Tpk1. Ein Vergleich der potentiellen Zielgene unter den verschiedenen Bedingungen ergab, dass Tpk2 an 32 Gene unter beiden Bedingungen bindet. Zudem kam es zu einer Überlappung der Zielgene von Tpk2 und Bcy1. Bei *Zcf31* und *Zcf23* handelt es sich beispielsweise um vorhergesagte Transkriptionsfaktoren und *She3* ist ein mRNA-bindendes Protein, welches essentiell für die Hyphenbildung ist (S. Znaidi, pers. Mitteilung an die CGD; Elson *et al.*, 2009).

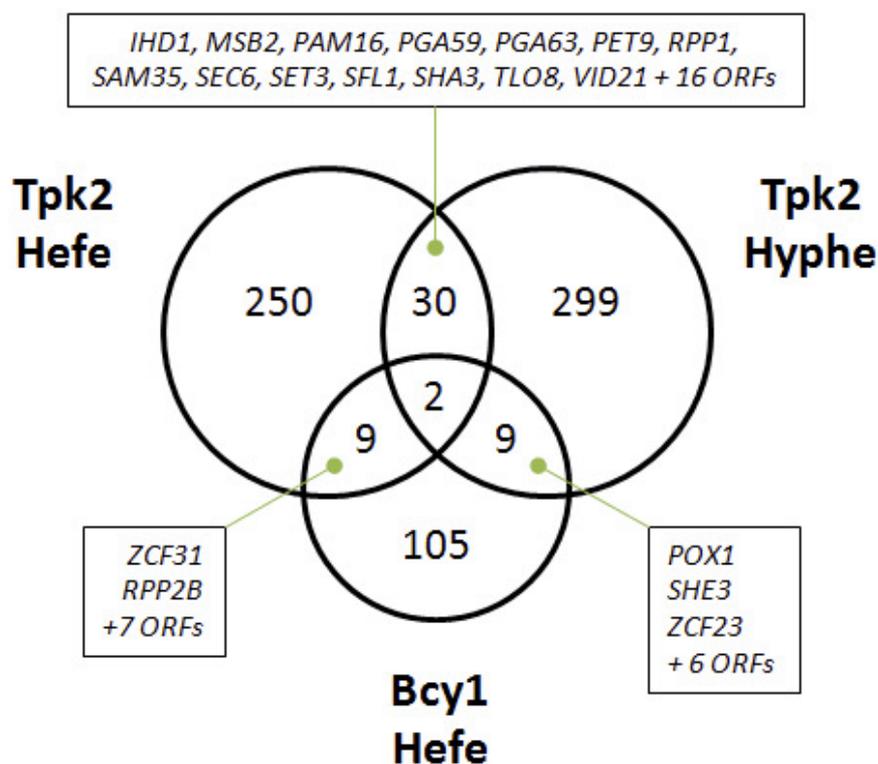


Abb. 3.16: Gemeinsame Zielgene von Tpk2 und Bcy1. Anhand der ChIP-chip-Analyse wurden Zielgene von Tpk2 und Bcy1 ermittelt und überlappende Gene identifiziert.

Bei der Analyse der Binderegionen fiel auf, dass die untersuchten Proteine unter Hefebedingungen größtenteils innerhalb von ORF-Regionen lokalisiert sind, während 30 min nach Induktion des Hyphenwachstums eine verstärkte Bindung der Proteine an nicht-kodierende Regionen der Chromosomen von *C. albicans* beobachtet wurde. Um mehr über diesen Lokalisationswechsel der PKA zu erfahren, wurden alle Binderegionen (siehe Anhang, Tabellen 9.1 bis 9.5) dahingehend untersucht, ob sie innerhalb und/oder außerhalb einer kodierenden Region liegen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.17 dargestellt und lässt vermuten, dass die PKA-Isoformen einen Einfluss auf die Regulation der Gene haben, an welche sie binden. Dies wird besonders bei der verstärkten Lokalisation der PKA-Isoformen an nicht-kodierende Bereiche nach Hypheninduktion ersichtlich.

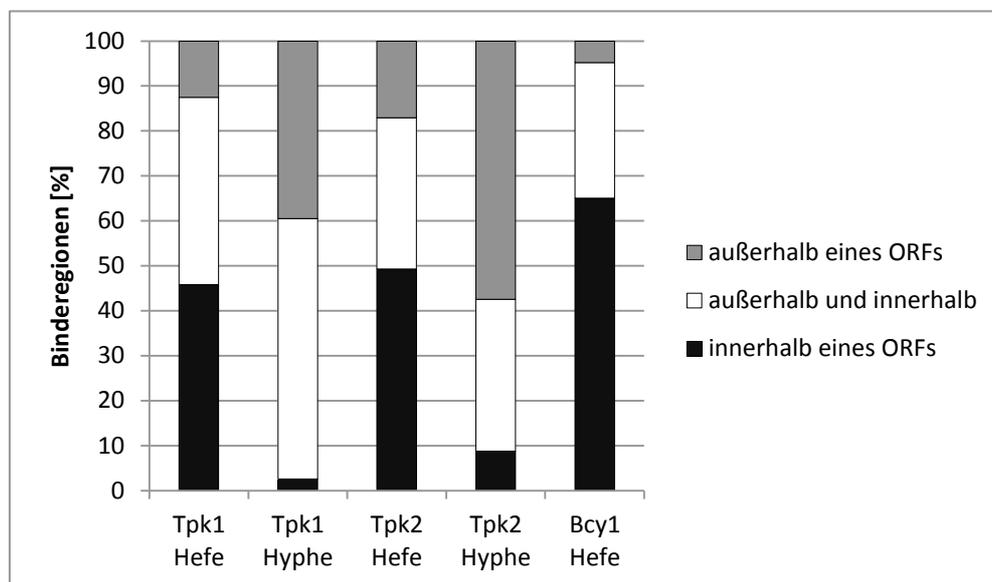


Abb. 3.17: Prozentuale Verteilung der Binderegionen der PKA innerhalb und/oder außerhalb von kodierenden Bereichen. Die Anzahl der Binderegionen der untersuchten Proteine ist in Tab. 3.2 dargestellt. Bei jeder Binderegion wurde untersucht, ob sie innerhalb und/oder außerhalb eines ORFs lokalisiert ist.

3.3.2.2 Bindung von Tpk1 an den *EFG1*-Promotor 30 min nach Hypheninduktion

Unter Hefewachstumsbedingungen konnte gezeigt werden, dass Tpk2, aber nicht Tpk1, an den *EFG1*-ORF bindet. Vergleichend dazu wurde der *EFG1*-Locus ebenfalls unter Hypheninduktionsbedingungen genauer untersucht. Bereits in der Übersicht der Binderegionen von Tpk1 an alle Chromosomen von *C. albicans* wurde deutlich, dass *EFG1* unter diesen Bedingungen eine Hauptbinderegion von Tpk1 ist (Abb. 3.13). Abb. 3.18 zeigt vergleichend die Bindung der PKA-Isoformen an den *EFG1*-Locus.

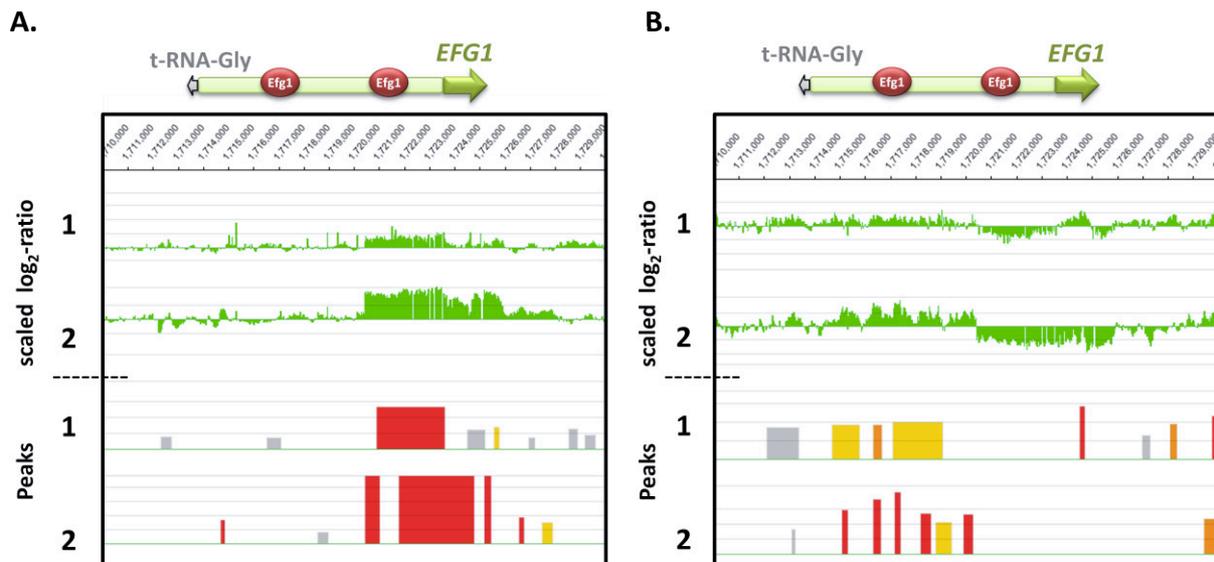


Abb. 3.18: Bindung von Tpk1 und Tpk2 an den *EFG1*-Promotor 30 min nach Hypheninduktion. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. Wie in Abb. 3.11 ist im oberen Abschnitt der ORF und der Promotor-Bereich von *EFG1* dargestellt. Im unteren Teil sind die „scaled \log_2 -ratios“ sowie die farblich kodierten Peaks der beiden Replikate (1 und 2) von Tpk1 (A) und Tpk2 (B) zu sehen.

30 min nach Hypheninduktion zeigte sich eine Bindung von Tpk1 am Promotor sowie am ORF von *EFG1*. Bei Tpk2 konnte ebenfalls eine Bindung an den *EFG1*-Promotor festgestellt werden, was aber lediglich bei einem Replikat der Fall war. Lassak *et al.* (2011) konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen an seinen eigenen Promotor bindet. Dabei ergaben sich zwei Hauptzielsequenzen, die im oberen Teil der Abb. 3.18 dargestellt sind (rot). Nach Induktion der Hyphenbildung war Efg1 nicht mehr an seinem Promotor lokalisiert. Interessanterweise bindet unter diesen Bedingungen Tpk1 an eine der beiden Hauptzielsequenzen von Efg1.

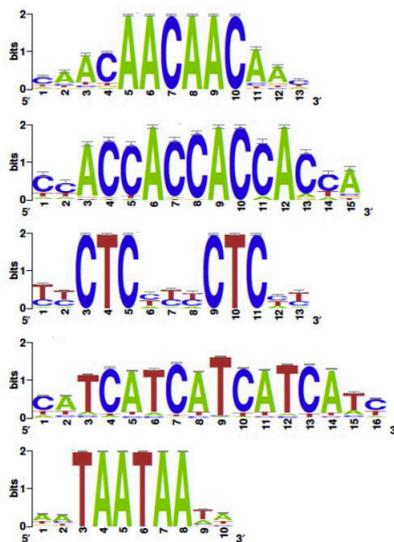
Besonders auffällig sind die scaled \log_2 -ratios der beiden Replikate für Tpk2, da sie über eine längere Sequenz einen negativen Wert haben. Dieses Ergebnis bedeutet, dass in der Kontrollprobe (ohne HA-Epitop) ein höheres Signal, als in der IP-Probe (mit HA-Epitop) gemessen wurde. Eigentlich sollte es durch die Verrechnung der Fluoreszenzsignale mit der Kontrollprobe zu keinen negativen Werten kommen, da mit den HA-Antikörpern in diesen Proben keine Präzipitation stattfinden kann. Diese Beobachtung könnte durch eine unspezifische DNA-Bindung des unmarkierten Proteins bzw. eine geringere unspezifische Bindung des HA-markierten Proteins erklärt werden, die durch die anschließende DNA-Amplifikation (Verwendung von WGA2-, WGA3-Kit; Abschnitt 2.7.6) verstärkt wird.

3.3.2.3 Analyse zur Identifizierung von PKA-Konsensus-Bindesequenzen unter Hypheninduktionsbedingungen

Vergleichend zu den Daten aus der Analyse einer Bindesequenz der PKA-Isoformen unter Hefewachstumsbedingungen (Abschnitt 3.3.1.3) wurde ebenfalls eine Analyse der 38 Binderegionen von Tpk1 sowie der 216 Binderegionen von Tpk2 30 min nach Hypheninduktion angefertigt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.19 dargestellt.

A.

Rang	Sequenz	E-value	p-value
1	aacn{0}aac	8.9e-28	2.1e-32
2	cacn{3}cac	8.4e-23	2.0e-27
3	accn{0}acc	4.9e-20	1.2e-24
4	cacn{1}acc	8.4e-20	2.0e-24
5	acan{0}aca	1.4e-17	3.3e-22



B.

Rang	Sequenz	E-value	p-value
1	aagn{0}aaa	5.0e-39	1.1e-43
2	aacn{0}aac	3.7e-29	8.4e-34
3	gaan{0}aaa	1.7e-28	3.8e-33
4	accn{0}acc	2.6e-28	5.9e-33
5	agan{0}aaa	1.1e-22	2.6e-27

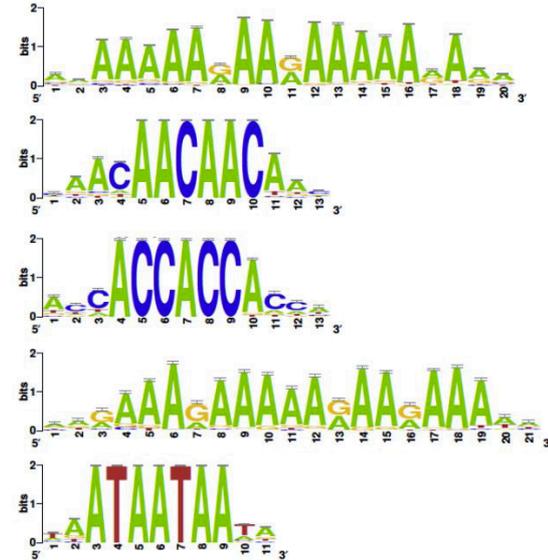


Abb. 3.19: Identifizierung von PKA-Bindemotiven unter Hypheninduktionsbedingungen. Mit Hilfe des Programms „RSAT dyad-analysis (spaced pairs)“ (van Helden *et al.*, 2000) wurden PKA-Bindemotive aus den 38 Tpk1- (A) und 216 Tpk2-Bindesequenzen (B) der ChIP-chip-Analyse ermittelt. Es wurde nach überrepräsentierten Monaden (Einheiten) von drei Nukleotiden gesucht („dyads“), die von 0 bis 20 Nukleotiden („spaced pairs“) getrennt aufgefunden werden können. Abgebildet ist jeweils die tabellarische Rangfolge der ermittelten überrepräsentierten „dyads“ und der jeweilige E- bzw. p-value. Die davon abgeleiteten Nukleotidverteilungs-Matrizen sind darunter abgebildet und stellen mögliche Bindemotive der PKA dar.

Wie bereits unter Hefewachstumsbedingungen, konnten AG- und AC-reiche Binderegionen identifiziert werden. Für beide PKA-Isoformen zeigte sich außerdem ein TAAT-Motiv. Interessanterweise konnte dieses Motiv ebenfalls für den Transkriptionsfaktor Efg1 gefunden werden, jedoch nur, wenn *C. albicans* in der Hefeform wuchs (Lassak *et al.*, 2011).

3.3.3 Transkriptspiegel von potentiellen PKA-Zielgenen

Unter Hefewachstumsbedingungen sind die Tpk1-, Tpk2- und Bcy1-Proteine größtenteils innerhalb von ORFs lokalisiert; unter Hypheninduktionsbedingungen befinden sich Tpk1 und Tpk2 fast ausschließlich an nicht-kodierenden Regionen bzw. Promotoren im Genom von *C. albicans* (Abb. 3.17). Dieser Wechsel der Binderegionen deutet darauf hin, dass die PKA-Isoformen an Gene binden, die sie auf transkriptioneller Ebene regulieren. Besonders durch die Bindung an nicht-kodierende Regionen liegt die Vermutung nahe, dass die Kinase-Isoformen nach Induktion der Hyphenbildung zur Regulation ihrer Zielgene beitragen. Es stellte sich daher die Frage, ob das Vorhandensein von Tpk1 bzw. Tpk2 einen Einfluss auf die Transkription der möglichen Zielgene hat. Für diese Experimente wurde die Stämme CAF2-1 (WT), I1HB6 (*tpk1*) und TPO7.4 (*tpk2*) unter Hefewachstums- sowie unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen und die Gesamt-RNA isoliert. Die quantitative Real-Time-PCR für Transkripte einzelner, ausgewählter Gene wurde wie in Abschnitt 2.6.11.3 beschrieben durchgeführt.

Transkriptspiegel von Tpk1-Zielgenen

Zunächst wurde der Einfluss von Tpk1 auf die potentiellen Zielgene *SSD1* und *SCH9* untersucht. Unter Hefewachstumsbedingungen bindet Tpk1 an den ORF von *SSD1* (Abb. 3.20 A; links). Dieses Gen kodiert für ein Protein, welches eine Rolle bei der Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden spielt (Gank *et al.*, 2008). *SCH9* wurde untersucht, da es für eine AGC-Kinase kodiert und die Bindung von Tpk1 innerhalb des ORFs unter Hypheninduktionsbedingungen in beiden Replikaten eindeutig zu erkennen war (Abb. 3.20 A; rechts). Bei dem Wildtypstamm blieb der Transkriptspiegel von *SSD1* unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen unverändert. In einer *tpk1*-Mutante hingegen zeigte sich ein erhöhter Transkriptspiegel (Abb. 3.20 B; links). Diese Beobachtung konnte unter beiden Bedingungen gemacht werden, jedoch war der Transkriptspiegel unter Hefewachstumsbedingungen, bei welchen Tpk1 an den ORF bindet, am höchsten. Tpk1 scheint somit die Transkription von *SSD1* zu inhibieren. Im Gegensatz dazu hat die Abwesenheit von Tpk1 keinen Einfluss auf den Transkriptspiegel von *SCH9* (Abb. 3.20 B; rechts).

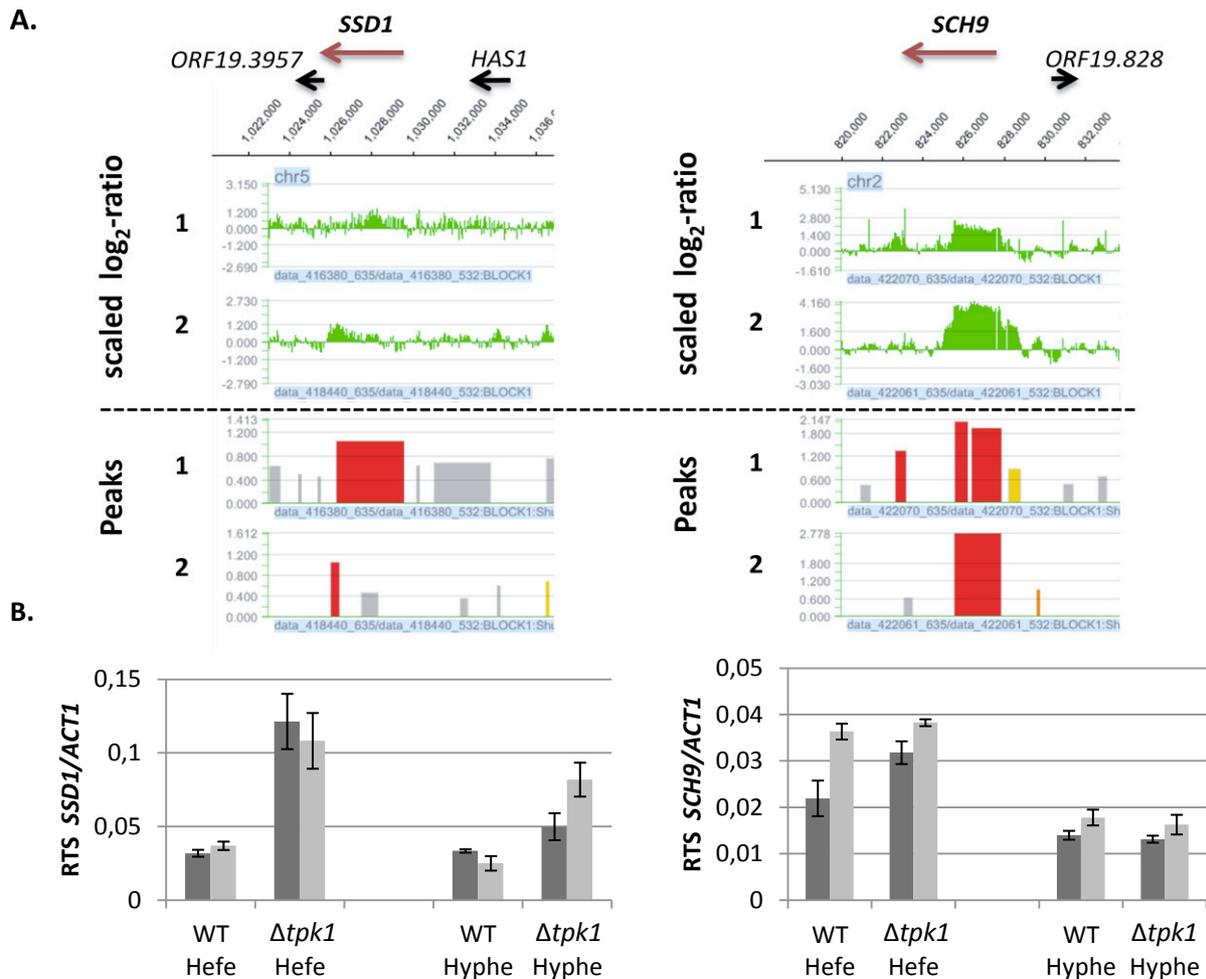


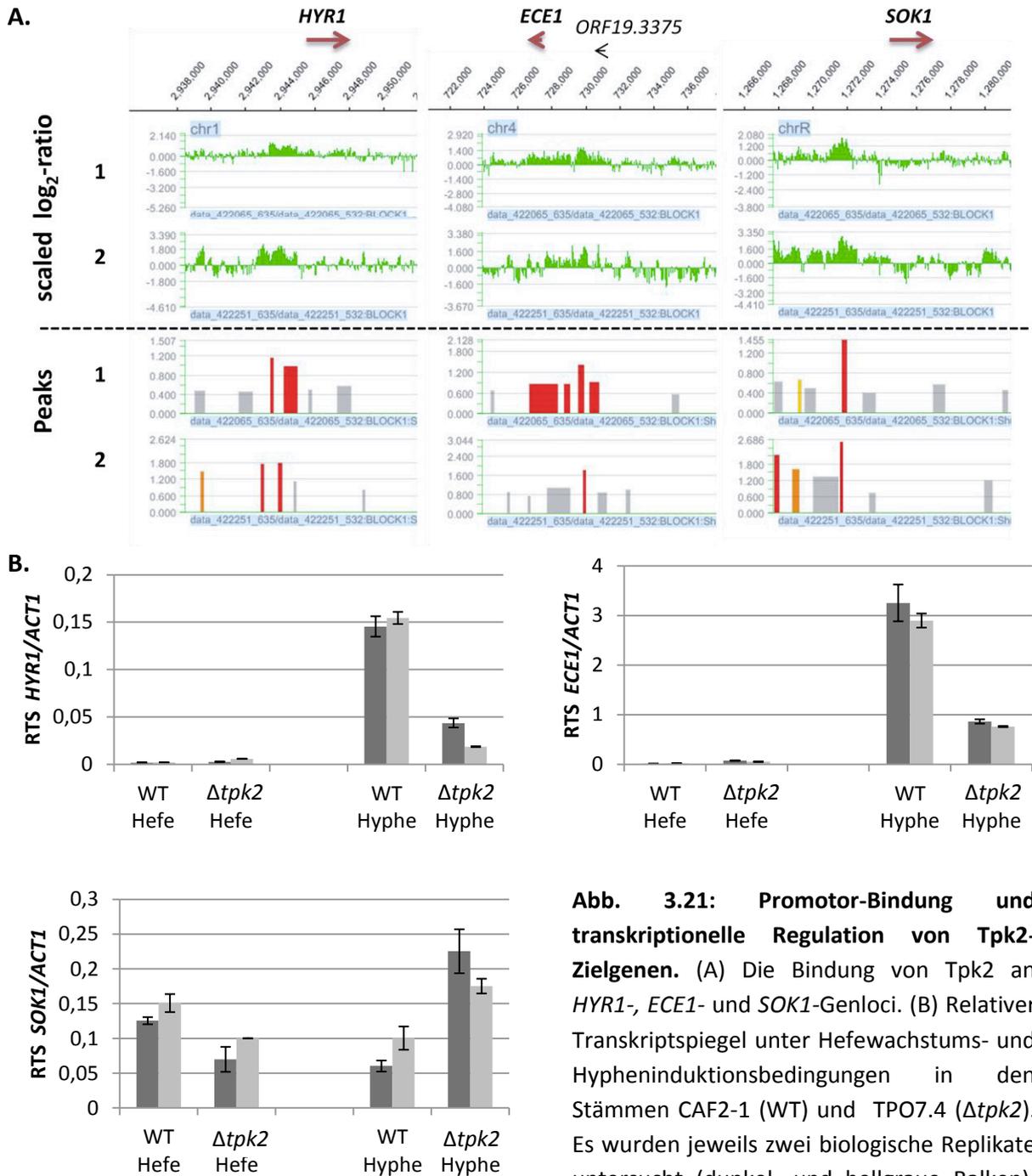
Abb. 3.20: Tpk1-Bindung und transkriptioneller Einfluss von Tpk1 auf *SSD1* und *SCH9*. (A) ChIP-chip-Ergebnisse der Bindung von Tpk1 an den genomischen Abschnitt von *SSD1* unter Hefewachstumsbedingungen sowie an *SCH9* unter Hypheninduktionsbedingungen. (B) Relativer Transkriptspiegel der beiden Gene unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen in den Stämmen CAF2-1 (WT) und IHB6 ($\Delta tpk1$). Es wurden jeweils zwei biologische Replikate untersucht (dunkel- und hellgraue Balken). Die Standardabweichungen beziehen sich auf die drei technischen Replikate, die von jeder cDNA-Probe angefertigt worden sind.

Transkriptspiegel von Tpk2-Zielgenen

In der ChIP-chip-Analyse zeigte sich, dass die PKA-Isoformen nach Hypheninduktion vermehrt an Promotorregionen lokalisiert sind. Wegen der großen Anzahl der Bindestellen scheint Tpk2 hierbei eine besondere Rolle zu spielen. Es ist von besonderem Interesse, dass die Kinase 30 min nach Hypheninduktion stromaufwärts der *HYR1*- und *ECE1*-ORFs bindet (Abb. 3.21 A), da es sich hierbei um zwei hyphenspezifische Gene handelt. Lassak *et al.* (2011) konnten 30 min nach Hypheninduktion keine Efg1-Bindung in der Nähe dieser Gene feststellen. Eine Bindung von Efg1 an die Promotorregionen dieser Gene war jedoch in der späten Phase der Hyphenbildung sowie unter Biofilm-induzierenden Bedingungen zu beobachten (Lu *et al.*, 2008; Nobile *et al.*, 2012). Ein Vergleich der Binderegionen von Tpk2

und Efg1 zeigt eine Überlappung der Bindestellen von Tpk2 und Efg1 in den Promotorregionen von *HYR1* und *ECE1*, jedoch sind die signifikanten Bindepeaks eher benachbart, als identisch. Die roten Signifikanz-Peaks zeigen eine Bindestelle von Tpk2 im *HYR1*-Promotor von -947 bp bis +216 bp (relativ zum ORF), während Efg1 unter Biofilm-induzierenden Bedingungen von -1882 bp bis -1382 bp bindet. Im Falle von *ECE1* bindet Tpk2 von -2575 bp bis -2119 bp und Efg1 bei -682 bp bis -183 bp (Nobile *et al.*, 2012). Lu *et al.* (2008) konnten unter Hefewachstums- sowie Hypheninduktionsbedingungen ebenfalls die Bindung von Efg1 an den *ECE1*-Promotor beobachten (-1350 bp bis -1103 bp). Eine weitere Tpk2-Bindestelle befindet sich stromaufwärts des *SOK1*-ORFs (Abb. 3.21 A). *SOK1* kodiert in *S. cerevisiae* für eine Kinase, welche in die cAMP-vermittelte Signalweiterleitung involviert ist (Ward *et al.*, 1994). Im Falle von *SOK1* überlappen die signifikanten Binderegionen von Tpk2 und Efg1 (-2462 bp bis -2195 bp; Nobile *et al.*, 2012).

Die Bindung von Tpk2 an die Promotorregionen der ausgewählten Gene ließ eine transkriptionelle Regulation durch Tpk2 vermuten. Daher wurde der Tpk2-abhängige Transkriptspiegel der drei Gene untersucht (Abb. 3.21 B). In dem Wildtypstamm stiegen die Transkriptspiegel von *HYR1* und *ECE1* 30 min nach Induktion der Hyphenbildung eindeutig an. Bei Abwesenheit von Tpk2 kam es unter Hypheninduktionsbedingungen bei beiden Genen nicht zu dieser Erhöhung des Transkriptspiegels. Im Falle von *SOK1* führte eine Abwesenheit von Tpk2 zu einem höheren Transkriptspiegel als im Wildtypstamm (Abb. 3.21 B). Somit korreliert die Anwesenheit von Tpk2 an Promotorregionen mit einer positiven oder negativen transkriptionellen Regulation der Gene.



In Abb. 3.16 wird verdeutlicht, dass Tpk2 32 Gene in der Hefe- sowie in der Hyphenform bindet. Eines dieser Gene ist *MSB2*, das für ein Sensorprotein aus dem MAPK-Signalweg kodiert (Roman *et al.*, 2009). Unter Hefebedingungen bindet Tpk2 innerhalb des ORFs von *MSB2*; 30 min nach Hypheninduktion verschiebt sich aber die Binderegion, so dass Tpk2 in der nicht-kodierenden Region stromaufwärts des *MSB2*-ORFs lokalisiert ist (Abb. 3.22 A).

Trotz dieser Bindungskonstellation, die auf eine Regulation des *MSB2*-Transkriptes hinweist, konnte unter den gewählten Bedingungen keine Veränderung des Transkriptspiegels bei Abwesenheit von Tpk2 beobachtet werden (Abb. 3.22 B).

A.

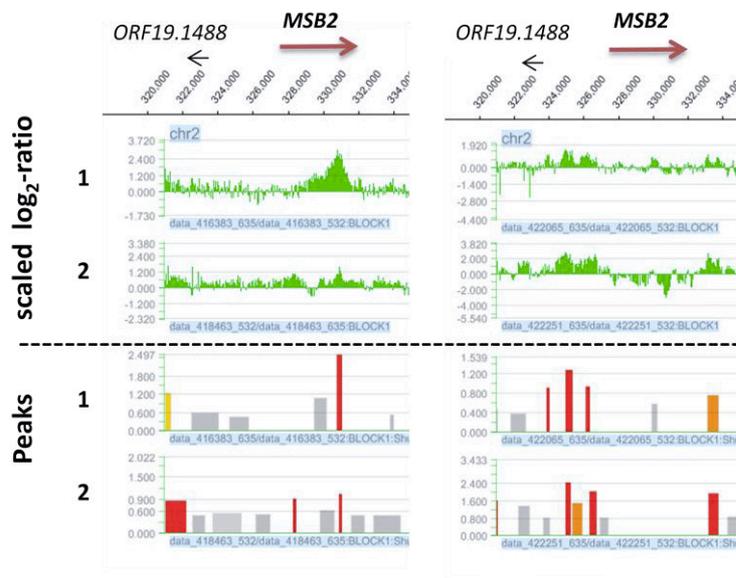
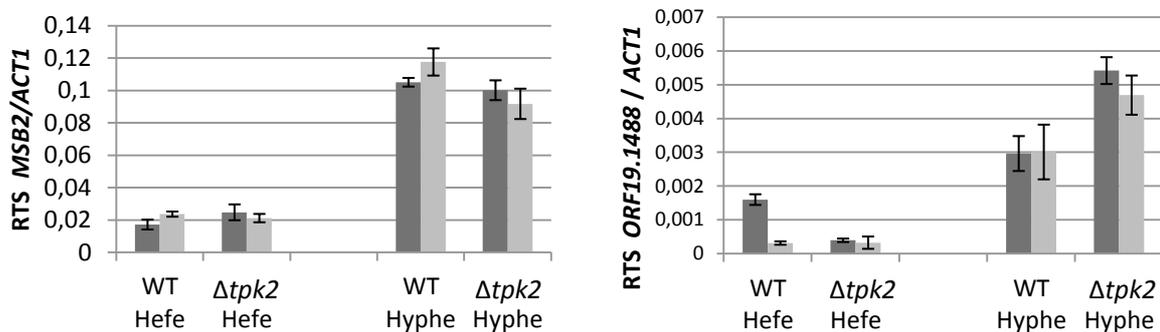


Abb. 3.22: Tpk2-Bindung und transkriptioneller Einfluss von Tpk2 auf *MSB2*.

(A) ChIP-chip-Ergebnisse der Bindung von Tpk2 an den *MSB2*-Locus unter Hefewachstums- (links) und Hypheninduktionsbedingungen (rechts). (B) Relativer Transkriptspiegel von *MSB2* und *ORF19.1488* in den Stämmen CAF2-1 (WT) und TPO7.4 ($\Delta tpk2$). Es wurden jeweils zwei biologische Replikate untersucht (dunkel- und hellgraue Balken). Die Standardabweichungen beziehen sich auf die drei technischen Replikate, die von jeder cDNA-Probe angefertigt worden sind.

B.



Da Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen in der intergenischen Region zwischen *ORF19.1488* und *MSB2* lokalisiert ist, könnte die Kinase jedoch die Transkription des divergent orientierten Gens *ORF19.1488* beeinflussen. Der Transkriptspiegel des uncharakterisierten Gens ist sehr gering, jedoch ist in Abb. 3.22 B zu erkennen, dass er in einer *tpk2*-Mutante 30 min nach Hypheninduktion im Vergleich zum Wildtypstamm erhöht ist. Somit ist die Anwesenheit von Tpk2 mit der transkriptionellen Regulation der Gene verbunden, an welche die Kinase-Isoform unter Hypheninduktionsbedingungen bindet. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die genomweiten Binderegionen der PKA-Isoformen von den Wachstumsbedingungen abhängen. Dabei spielt die Anwesenheit von Tpk2 bei Hypheninduktion an Promotorregionen eine besondere Rolle, da sie Einfluss auf die Transkription der Zielgene hat.

3.3.4 ChIP-chip-Analysen zur Ermittlung von genomweiten Zielsequenzen von Sch9

Die AGC-Kinase Sch9 beeinflusst das Zellwachstum sowie die Hyphenbildung in *C. albicans* (Liu *et al.*, 2010). Das Protein ist unter hypoxischen Bedingungen (< 10 % O₂) und erhöhten CO₂-Konzentrationen (> 1 %) ein Repressor der Hyphenbildung. Kolonien einer *sch9*-Mutante weisen zudem eine geringere Größe auf (Stichternoht, 2009).

Pascual-Ahuir und Proft (2007) konnten zeigen, dass Sch9 in *S. cerevisiae* Chromatin-assoziiert ist und Gene der Osmostressantwort reguliert. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PKA-Isoformen genomweite Zielsequenzen besitzen, wurde ebenfalls eine ChIP-chip-Analyse von der PKB Sch9 durchgeführt. Dafür wurde der Stamm AF1006 (*SCH9^{HA}/sch9*) sowie der Kontrollstamm CAS1 (*SCH9/sch9*) zunächst unter Hefewachstumsbedingungen bei Normoxie angezogen. Die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben mit 2 biologischen Replikaten durchgeführt. Ein exemplarisches Ergebnis ist in Abb. 3.23 dargestellt.

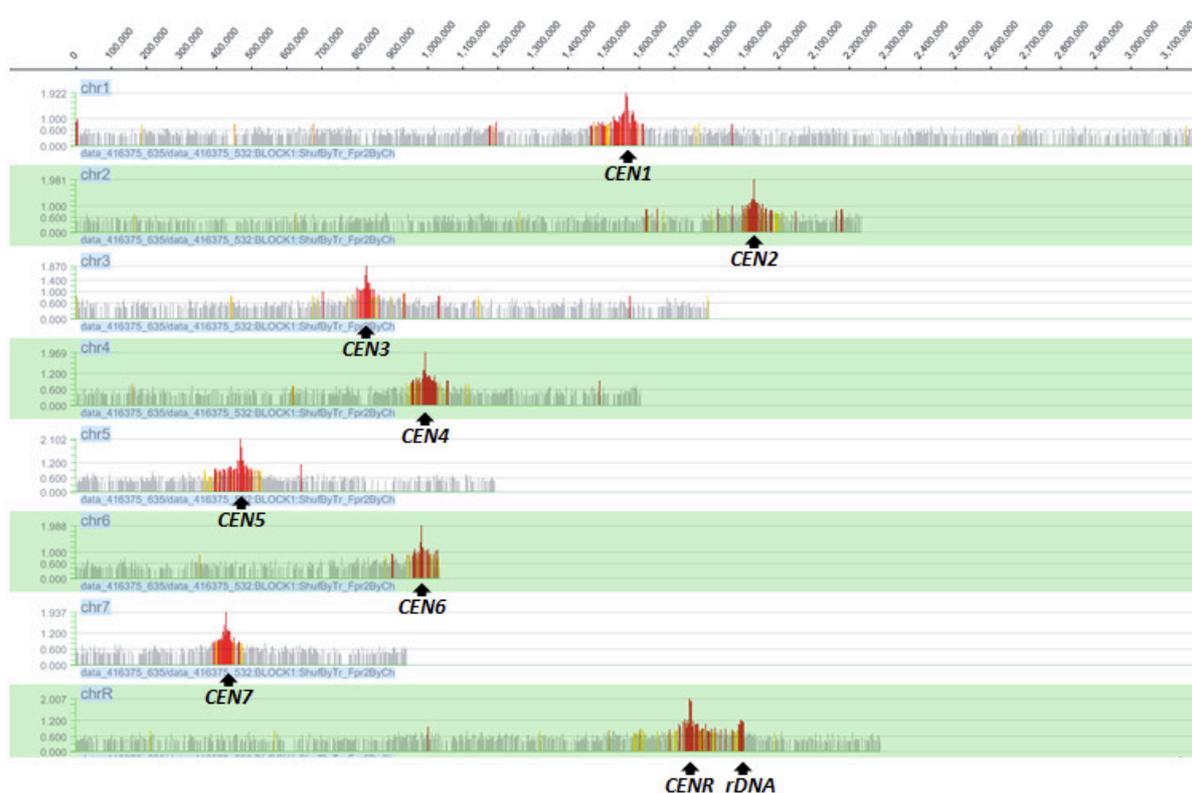


Abb. 3.23: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Sch9 unter Hefewachstumsbedingungen. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Der Stamm AF1006 (*SCH9^{HA}/sch9*) und der Kontrollstamm CAS1 (*SCH9/sch9*) wurden in jeweils 50 ml YPD angezogen und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C inkubiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. Zu sehen sind die Binderegionen von Sch9 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans*. Markiert sind die Positionen der Zentromere (CENs) aller Chromosomen und der rDNA auf Chromosom R.

Bereits in der ersten Übersicht der Ergebnisse der ChIP-chip-Analyse von Sch9 zeigte sich, dass diese Kinase eine eindeutige Bindestelle auf jedem Chromosom von *C. albicans* besitzt. An diesen Stellen kam es zu einer deutlichen Akkumulation der roten Signifikanz-Peaks. Bei näherer Betrachtung stellte sich heraus, dass Sch9 mit allen Zentromeren (*CENs*) der Chromosomen assoziiert ist. Die Übersicht des zweiten Replikats bestätigte die Bindung in den *CEN*-Regionen der Chromosomen.

Stichernoth (2009) beobachtete, dass Sch9 unter hypoxischen Bedingungen, hohen CO_2 -Konzentrationen und Temperaturen unter 37°C einen hyperfilamentösen Phänotypen zeigt. Um die Bindung von Sch9 weiter zu untersuchen, wurden daher ChIP-chip-Analysen von Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen gewachsen sind, durchgeführt. Dafür wurde eine definierte Atmosphäre in einer Hypoxiebank erzeugt und Hauptkulturen der Stämme AF1006 (*SCH9^{HA}/sch9*) und CAS1 (*SCH9/sch9*) in YPS bei 25°C bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert. Ein Experiment erfolgte lediglich unter hypoxischen Bedingungen ($0,2\% \text{O}_2$) und in einem weiteren Ansatz wurden zusätzlich $6\% \text{CO}_2$ angewendet ($0,2\% \text{O}_2, 6\% \text{CO}_2$).

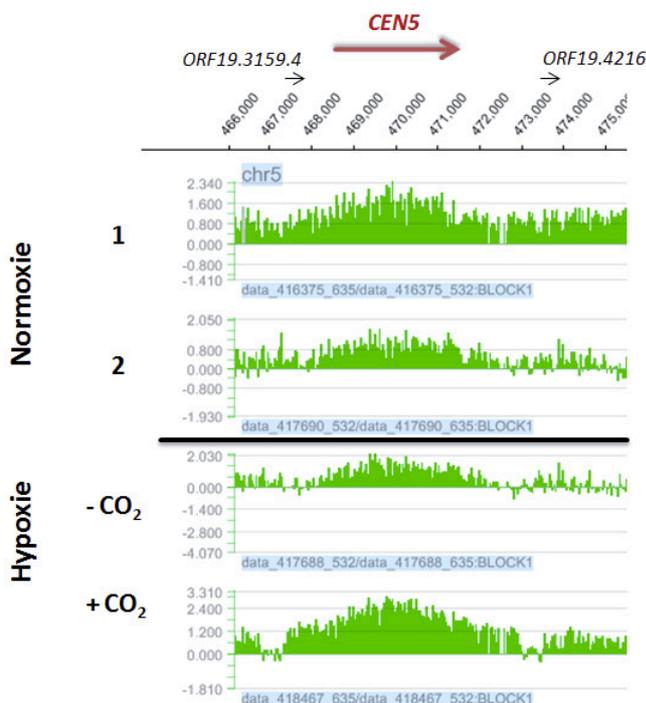


Abb. 3.24: Bindung von Sch9 an die Zentromerregionen. Dargestellt sind die Ergebnisse der beiden ChIP-chip-Replikate unter normoxischen Bedingungen (1 und 2) sowie unter hypoxischen Bedingungen ($0,2\% \text{O}_2$) in Ab- ($-\text{CO}_2$) und Anwesenheit ($+\text{CO}_2$) von $6\% \text{CO}_2$. Exemplarisch sind die scaled \log_2 -ratio-Werte an der Zentromerregion von Chr5 abgebildet. Die Pfeile markieren die beiden nächstgelegenen ORFs, die Pfeilrichtung gibt die Orientierung an.

Unter den oben genannten Bedingungen konnte erneut eine Bindung von Sch9 an allen *CENs* von *C. albicans* beobachtet werden (siehe Anhang, Abb. 9.2). Dieser Bereich war unter allen Bedingungen die Hauptbinderegion des Proteins. Exemplarisch dafür ist in Abb. 3.24 die Bindung des Proteins an die *CEN*-Region von Chr5 abgebildet. Eine weitere signifikante

Bindestelle des Proteins, die unter allen Bedingungen beobachtet werden konnte, befindet sich stromabwärts der *CEN*-Region auf ChrR. Diese Bindestelle entspricht dem *RDN1*-Locus, welcher die Gene für die 18S-, 5.8S-, 25S- und 5S-rRNA beinhaltet. Unter normoxischen sowie unter hypoxischen Bedingungen wurden ansonsten keine weiteren Binderegionen beobachtet. Unter hypoxischen Bedingungen und in Anwesenheit von 6 % CO₂ waren weitere rote Signifikanz-Peaks zu sehen. Da hierbei jedoch nur ein Replikat angefertigt worden war, ist zu den Binderegionen keine eindeutige Aussage möglich.

Die Bindung von Sch9 an genomische Regionen wurde mit Hilfe der ChIP-chip-Methode ebenfalls in *S. cerevisiae* untersucht (siehe Anhang, Abb. 9.3). Dafür wurde der Stamm MAP85 (Sch9^{HA}) sowie der Kontrollstamm W303-1A bei 30 °C in jeweils 50 ml YPD bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Beim Vergleich der Ergebnisse zeigte sich, dass Sch9 in *S. cerevisiae* nicht an den *CEN*-Regionen lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Es wurde jedoch eine gemeinsame Bindestelle der Proteine in den beiden Organismen beobachtet. In *S. cerevisiae* bindet Sch9 ebenfalls an den *RDN1*-Locus, welcher auf Chr12 zu finden ist. Vergleichend wird in Abb. 3.25 die Bindung von Sch9 an den *RDN1*-Locus in *C. albicans* (A) und *S. cerevisiae* (B) unter den verschiedenen Bedingungen dargestellt.

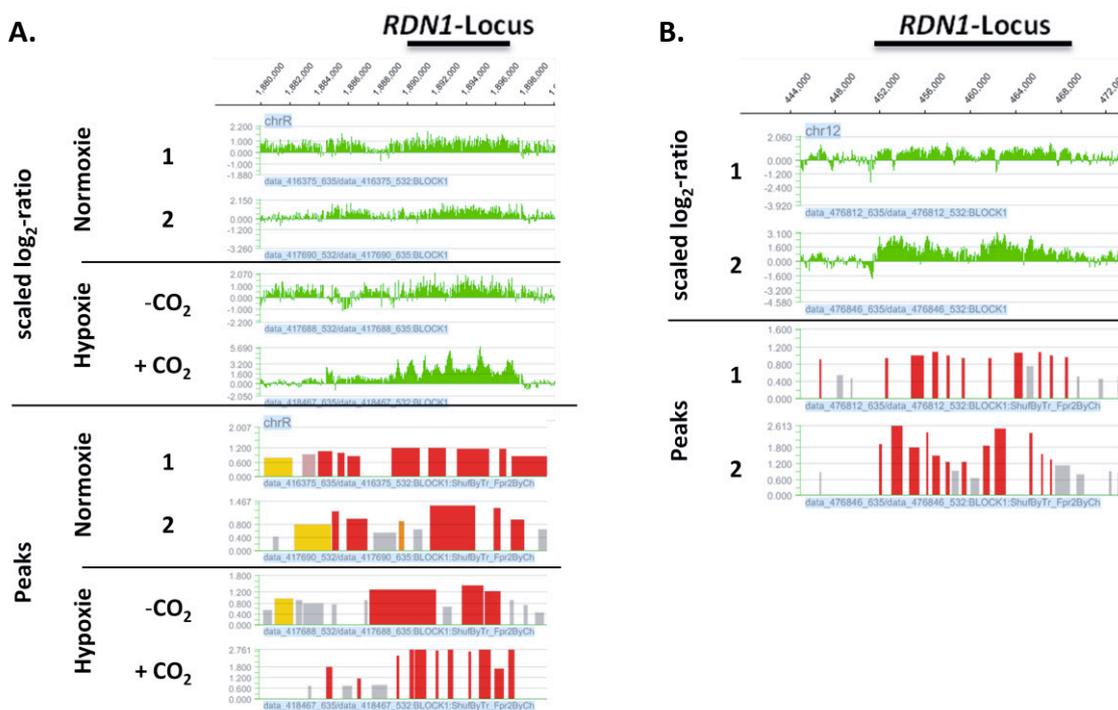


Abb. 3.25: Bindung von Sch9 an den *RDN1*-Locus. Bindung von Sch9 unter verschiedenen Bedingungen in *C. albicans* (A) und in *S. cerevisiae* (B). Zu sehen sind die scaled log₂-ratios sowie die roten Signifikanz-Peaks der Replikate am *RDN1*-Locus (schwarzer Balken) auf Chromosom R (A, *C. albicans*), bzw. Chromosom 12 (B, *S. cerevisiae*).

3.4 Hypoxischer Signalweg von Sch9

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. albicans* ist der Dimorphismus. Der Wechsel zwischen der Hefe- und Hyphenform ermöglicht dem Pilz eine rasche Verteilung über den Blutstrom (Hefeform) sowie die Penetration von Epithelzellen des Gewebes (Hyphenform). Dadurch, dass *C. albicans* verschiedene Nischen des menschlichen Körpers besiedelt, muss sich der Pilz an verschiedene Temperaturen und Gaskonzentrationen anpassen. Dies erfordert eine Regulation der Signalwege, welche den Dimorphismus steuern. Der Transkriptionsfaktor Efg1 ist der zentrale Regulator der Hyphenbildung in *C. albicans*. Unter normoxischen Bedingungen ist er ein Aktivator, während er unter hypoxischen Bedingungen ein Repressor der Hyphenbildung ist (Doedt *et al.*, 2004; Setiadi *et al.*, 2006). In früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass die Regulation der Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen unter anderem durch die Proteinkinase B Sch9 beeinflusst wird. Sch9 ist bei Temperaturen unter 37 °C, niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (< 10 %) und erhöhtem CO₂-Gehalt (> 1 %) ein Repressor der Hyphenbildung, da eine *sch9*-Mutante unter diesen Bedingungen einen hyperfilamentösen Phänotypen ausbildet (Stichternoth, 2009). Daher wird vermutet, dass unter hypoxischen Bedingungen neben dem PKA-Signalweg ein alternativer Signalweg die Hyphenbildung reguliert.

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist Sch9 Teil der TORC1-Sch9-Rim15-Kaskade (Wanke *et al.*, 2008). Die Serin/Threoninkinase TOR (target of rapamycin) reguliert das Zellwachstum, die Proliferation sowie die Langlebigkeit von Zellen und ist strukturell sowie funktionell von der Hefe bis zu den Säugern konserviert (Jacinto und Lorberg, 2008). Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass unter nährstoffreichen Bedingungen Sch9 durch TORC1 phosphoryliert und somit aktiviert wird (Urban *et al.*, 2007). Nachdem Sch9 aktiviert wird, hemmt das Protein Rim15, wobei es sich ebenfalls um eine AGC-Kinase handelt (Wanke *et al.*, 2008). In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Signalkaskade auch in *C. albicans* existiert und den alternativen Signalweg unter Hypoxie darstellt.

3.4.1 Konstruktion einer *sch9 rim15* - Doppelmutante

Es wird angenommen, dass der hyperfilamentöse Phänotyp der *sch9*-Mutante durch eine erhöhte Aktivität der nachgeschalteten Kinase Rim15 zu Stande kommt. Daher sollte eine *rim15 sch9* - Doppelmutante hergestellt und ihr Phänotyp unter Hypoxie untersucht werden. Die Disruption erfolgte gemäß dem Prinzip der „URA-Blaster“-Methode nach Fonzi und Irwin

(1993). Eine schematische Darstellung der Disruption ist in Abb. 3.26 dargestellt. Durch Verwendung des Disruptionsplasmides p5921-SCH9dis konnte *SCH9* in einer homozygoten *rim15*-Mutante (CAR23-7-5-1) disruptiert werden. Das Plasmid beinhaltet *SCH9*-Homologien (3'- und 5'-Bereich) sowie den „URA-Blaster“ (*hisG-URA3-hisG*). Durch Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Bgl*II entstand ein 5558 bp großes Disruptionsfragment, das durch homologe Rekombination in den Stamm CAR23-7-5-1 (*rim15/rim15*; Abb. 3.26 A) integriert wurde. Nach der Disruption des ersten Alleles wurden die Transformanten (*rim15/rim15 SCH9/sch9::hisG-URA-hisG*; Abb. 3.26 B) auf 5-FOA-Medium (Abschnitt 2.2.6) selektiert. Mit dem Primerpaar Sch9 for/rev wurde mit den Kolonien (*rim15/rim15 SCH9/sch9::hisG*; Abb. 3.26 C) eine Kolonie-PCR durchgeführt, wobei eine Bande mit einer erwarteten Größe von ca. 2800 bp erhalten wurde (Daten nicht gezeigt). Die dadurch ermittelten Halbdisruptanten wurden erneut mit dem Disruptionsplasmid transformiert und die erhaltenen Transformanten (*rim15/rim15 sch9::hisG-URA-hisG/sch9::hisG*; Abb. 3.26 D) mit Hilfe einer Southern-Blot-Analyse (Abschnitt 2.6.12) verifiziert.

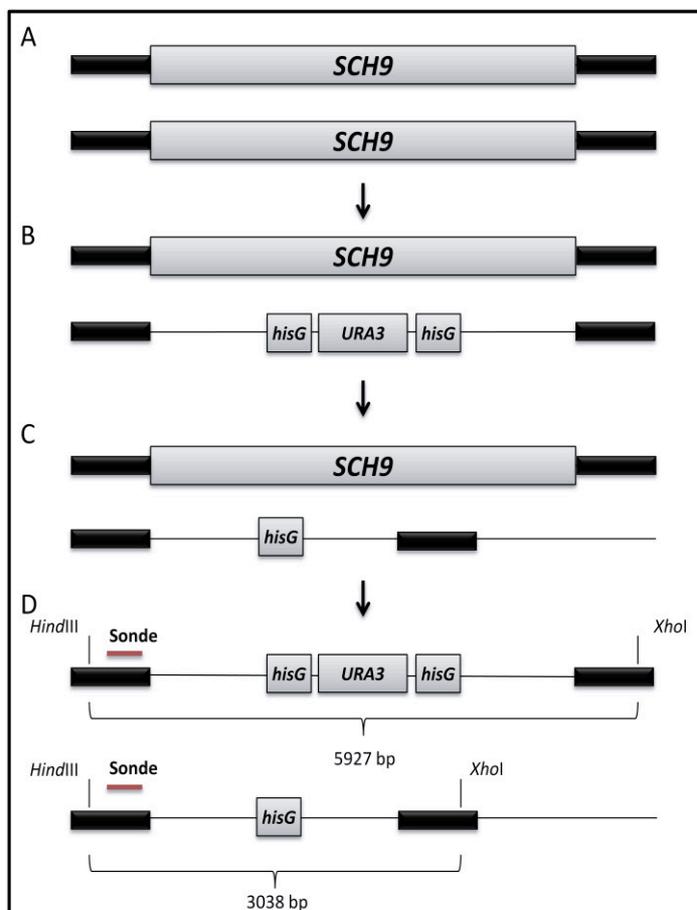


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Disruption von *SCH9*. (A und B) Der Ausgangsstamm CAR23-7-5-1 (*rim15/rim15*) wurde mit dem Disruptionsfragment transformiert. (C) Genotyp nach Exzision von *URA3*. (D) Genotyp nach Disruption des zweiten *SCH9*-Allels und schematische Darstellung der Restriktion für die Southern-Blot-Analyse. Die 380 bp große Sonde (rote Markierung) hybridisiert stromaufwärts von dem integrierten Disruptionsfragment. Durch Disruption des ersten Allels von *SCH9* und anschließender Exzision von *URA3* wurde ein 3038 bp großes Fragment erwartet. Bei Disruption des 2. Allels von *SCH9* wurde ein zusätzliches 5927 bp großes Fragment erwartet. Der *SCH9*-ORF ist grau markiert, homologe Bereiche im 3'- und 5'-Bereich von *SCH9* sind schwarz markiert.

Für die Southern-Blot-Analyse wurde die chromosomale DNA der Transformanten isoliert und 1,5 µg in einem Endvolumen von 200 µl mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xho*I verdaut. Als Kontrolle diente chromosomale DNA des Wildtypstamms (CAF2-1). Die verwendete Sonde (Primerpaar: Sch9Sonde for/rev) war 380 bp groß und hybridisierte stromaufwärts von dem integrierten Disruptionsfragment. Bei der Analyse wurden zwei Banden erwartet: Nach der ersten Transformation und der Entfernung des Selektionsmarkers *URA3* sollte eine 3038 bp große Bande entstehen. Wurde das zweite Allel ebenfalls durch die zweite Transformation disruptiert, sollte eine zusätzliche Bande bei 5927 bp entstehen. Die erwartete Bande für die Negativkontrolle (CAF2-1) lag bei ca. 1500 bp. Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse ist in Abb. 3.27 dargestellt.

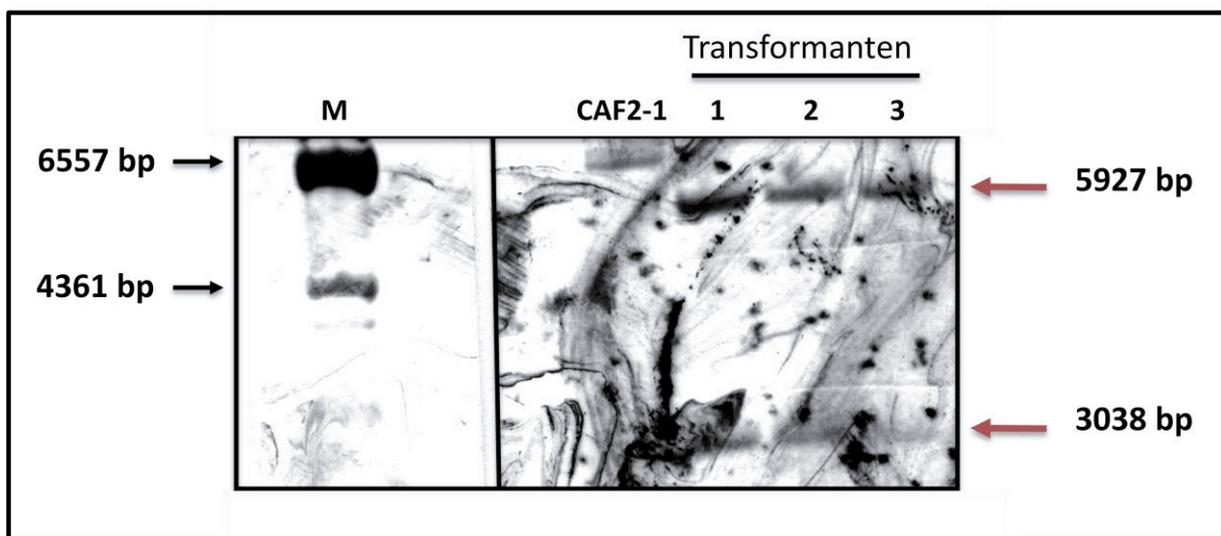


Abb. 3.27: Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der Disruption von *SCH9*. Es wurden jeweils 1,5 µg DNA mit *Hind*III und *Xho*I verdaut und in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Bei Disruption beider Allele von *SCH9* wurden 5927 bp und 3038 bp große Fragmente erwartet. Als Negativkontrolle diente chromosomale DNA von CAF2-1 (Wildtypstamm) in Spur 1. In Spur 2, 3 und 4 wurde die verdaut DNA von 3 Transformanten aufgetragen.

In Abb. 3.27 ist zu erkennen, dass bei der Negativkontrolle eine unklare Bande bei ca. 6,4 kb auftaucht, welche aufgrund des hohen Hintergrunds aber vernachlässigt wurde. Die Banden der zu analysierenden Transformanten (1, 2 und 3) sind hingegen distinkt und weisen die erwarteten Größen auf. Somit stellen diese Stämme Volldisruptanten von *SCH9* in einer *rim15*-Mutante dar und wurden als AF1002, AF1002.2 und AF1002.3 bezeichnet.

3.4.2 Morphologische Untersuchung der *sch9 rim15* - Doppelmutante

Nach der Konstruktion einer homozygoten *rim15 sch9* - Doppelmutante wurde der Phänotyp des Stammes untersucht. Abb. 3.28 zeigt Einzelkolonien der Stämme CAF2-1 (WT), CCS3 (*sch9*), CCS6 (*rim15*) und AF1002 (*rim15 sch9*), welche auf YPS-Platten vereinzelt und für 3 Tage bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C inkubiert worden sind. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Untersuchungen unter diesen Bedingungen durchgeführt, da sie auch in Vorarbeiten verwendet wurden (Stichternoht, 2009).

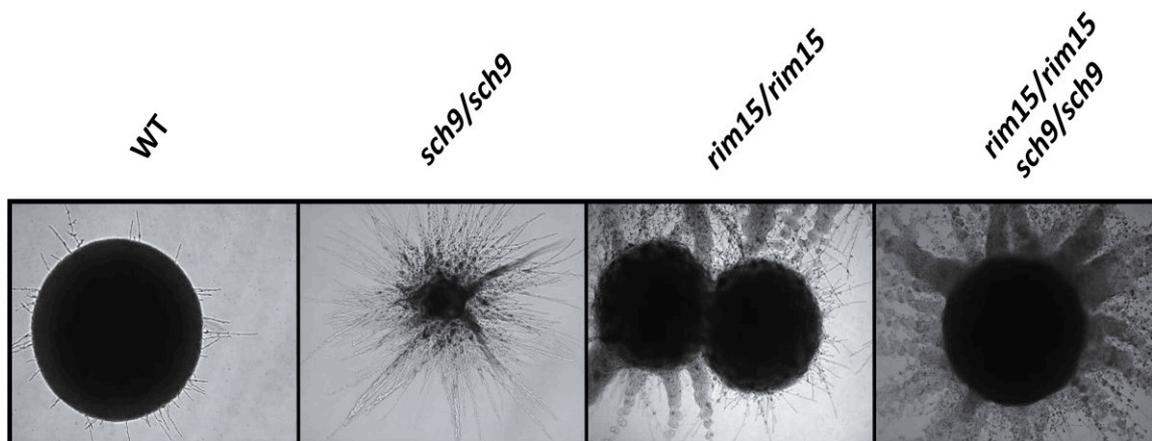


Abb. 3.28: Hyphenbildung verschiedener Stämme unter hypoxischen Bedingungen. Die Stämme CAF2-1 (WT), CCS3 (*sch9*), CCS6 (*rim15*) und AF1002 (*rim15 sch9*) wurden auf YPS-Platten vereinzelt und für 3 Tage bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C inkubiert.

In Abb. 3.28 ist zu erkennen, dass der Wildtypstamm unter diesen Bedingungen nur wenige Hyphen ausbildet, während die *sch9*-Mutante einen hyperfilamentösen Phänotypen aufweist (Stichternoht, 2009). Durch die Disruption von *RIM15* kam es zur Ausbildung einiger Hyphen, jedoch zu weitaus weniger als in der *sch9*-Mutante. Eine Disruption der Gene für beide AGC-Kinasen führt zu einem filamentösen Phänotyp, welcher der *sch9*-Mutante ähnelt. Somit kann eine erhöhte Aktivität von Rim15 als Erklärung für den *sch9*-Phänotypen ausgeschlossen werden.

3.4.3 Einfluss von Rapamycin und Koffein auf die Zellmorphologie

Wanke *et al.* (2008) zeigten, dass TORC1 in *S. cerevisiae* sowohl durch Rapamycin, als auch durch Koffein gehemmt werden kann. Da die TOR-Kinase strukturell evolutionär konserviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass sie in *C. albicans* ebenfalls stromaufwärts von Sch9 agiert und durch Rapamycin und Koffein gehemmt werden kann. Wird Sch9 in *C. albicans* von Tor1 aktiviert, konnte erwartet werden, dass der Wildtypstamm in Anwesenheit der TOR-

Inhibitoren den hyperfilamentösen *sch9*-Phänotypen aufweist. Für dieses Experiment wurden die Stämme auf YPS-Platten in An- und Abwesenheit von Rapamycin bzw. Koffein vereinzelt und für 3 Tage bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C inkubiert.

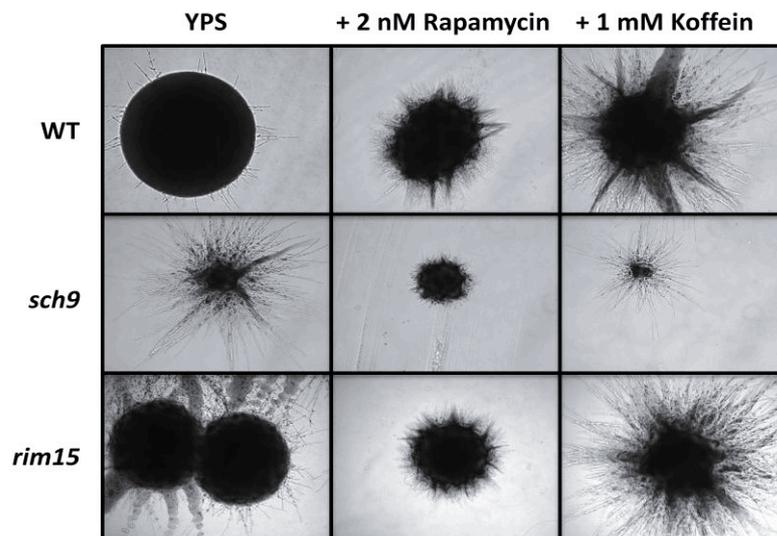


Abb. 3.29: Hyphenbildung verschiedener Stämme in An- und Abwesenheit von Rapamycin und Koffein. Die Stämme CAF2-1 (WT), CCS3 (*sch9*) und CCS6 (*rim15*) wurden auf YPS-Platten in An- und Abwesenheit von 2 nM Rapamycin bzw. 1 mM Koffein ausplattiert. Nach 3 Tagen bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C wurde die Hyphenbildung beobachtet.

Für dieses Experiment wurden zunächst verschiedene Konzentrationen der TOR-Inhibitoren getestet und letztendlich 2 nM Rapamycin bzw. 1 mM Koffein verwendet, da durch das Einsetzen einer höheren Konzentration das Zellwachstum beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.29 ist zu erkennen, dass der Phänotyp des Wildtypstammes bei Anwesenheit der TOR-Inhibitoren dem Phänotypen der *sch9*-Mutante ähnelt. Somit war es möglich, die Tor1-Kinase durch Zugabe von Rapamycin oder Koffein zu inhibieren. Wie im Wildtypstamm wurde auch in einer *rim15*-Mutante das Hyphenwachstum in Anwesenheit der Inhibitoren angeregt, während in der *sch9*-Mutante keine Verstärkung der Hyphenbildung zu beobachten war. Diese hypoxischen Phänotypen wurden nur in Anwesenheit von CO₂ beobachtet und lassen vermuten, dass bei *C. albicans* Sch9 durch Tor1 aktiviert wird. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in *C. albicans* ein Rim15-unabhängiger Tor1-Sch9-Signalweg existiert, der die Hyphenbildung unter bestimmten hypoxischen Bedingungen reprimiert.

3.4.4 Untersuchung bekannter Komponenten der Hyphenregulation auf *sch9*-Phänotyp

Um aufzuklären, welche Regulatoren des Hyphenwachstums eine Rolle im Sch9-Signalweg spielen, wurden die morphologischen Phänotypen von verschiedenen Mutantenstämmen untersucht. Die verschiedenen Stämme wurden auf YPS-Platten unter den Bedingungen angezogen, bei denen die Deletion von *SCH9* zu einem hyperfilamentösen Phänotypen führt. Die Hyphenbildung wurde jeweils in An- und Abwesenheit von 1 mM Koffein untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.30 dargestellt, wobei die Wildtypstämme CAF2-1 und CAI4 sowie die *sch9*-Mutante als Kontrollstämme dienten. Im Folgenden sind die Funktionen der Gene beschrieben, die den Mutanten fehlen, sowie ihre Phänotypen unter den Versuchsbedingungen.

- *ras1* (Stamm Can52)
 - *RAS1* kodiert für eine GTPase, die äußere Signale zur Hypheninduktion weiterleitet, indem sie die MAPK-Kaskade und den PKA-Signalweg aktiviert (Feng *et al.*, 1999).
 - Während der Wildtyp in Anwesenheit von Koffein Hyphen ausbildet, war die *ras1*-Mutante nicht fähig, Hyphen zu bilden.
- *cyr1* (Stamm CR216)
 - Durch die Adenylatcyclase Cyr1 wird der second messenger cAMP akkumuliert, welcher für die Aktivierung der PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 benötigt wird (Rocha *et al.*, 2001).
 - Wie die *ras1*-Mutante war die *cyr1*-Mutante nicht in der Lage in Anwesenheit von Koffein Hyphen auszubilden.
- *tpk1* und *tpk2* (Stämme HPY300U und HPY400U)
 - Die PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 sind die zentralen Komponenten des PKA-Signalweges und regulieren durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Efg1 die Hyphenbildung (Bockmühl *et al.*, 2001; Sonneborn *et al.*, 2000).
 - Eine Deletion von *TPK2* führt zu einem Verlust der Hyphenbildung in Anwesenheit von Koffein, während die *tpk1*-Mutante in der Lage war, einige wenige Hyphen zu bilden.
- *cph1* (Stamm JLC19)
 - Der Transkriptionsfaktor Cph1 ist Teil der MAPK-Kaskade, welche das hyphale Wachstum reguliert (Liu *et al.*, 1994).
 - Die *cph1*-Mutante zeigte unter den getesteten Bedingungen denselben Phänotypen wie der Wildtypstamm.

- *czf1* (Stamm CKY230)
 - Giusani *et al.* (2002) und Noffz *et al.* (2008) zeigten mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System, dass Czf1 ein Interaktionspartner von Efg1 ist und wiesen durch Doppelmutanten nach, dass Czf1 bei Einbettung in Agar (d.h. bei Sauerstofflimitierung) eine reprimierende Wirkung auf Efg1 hat.
 - *CZF1* war auf YPS-Agar mit Koffein für die Aufrechterhaltung der Hyphenbildung notwendig (*czf1*-Mutante zeigte keine Hyphenbildung).
- *ace2* (Stamm MK106)
 - Ace2 wird für die Zellseparation sowie die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen benötigt (Kelly *et al.*, 2004).
 - Die *ace2*-Mutante zeigte in Anwesenheit von Koffein eine abgeschwächte Hyphenbildung.
- *nrg1* (Stamm MMC3)
 - Der Transkriptionsfaktor Nrg1 hat einen reprimierenden Einfluss auf die Hyphenbildung, indem er das Protein Tup1 an die Promotoren hyphenspezifischer Gene rekrutiert (Murad *et al.*, 2001a).
 - Trotz der bekannten Repressorfunktion von Nrg1 unter normoxischen Bedingungen, zeigte eine *nrg1*-Mutante unter hypoxischen Bedingungen in Anwesenheit von Koffein keine gesteigerte, sondern eine verminderte Hyphenbildung.
- *flo8* (Stamm CCF3)
 - Der Transkriptionsfaktor Flo8 reguliert viele Gene, die auch von Efg1 reguliert werden. Eine Interaktion mit Efg1 konnte nachgewiesen werden, wobei die Proteine vermutlich zusammen die Hyphenbildung steuern (Noffz *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2006).
 - Wird der Tor1-Sch9-Signalweg durch Koffein inhibiert, wird Flo8 für die Filamentierung benötigt (*flo8*-Mutante zeigte keine Hyphenbildung).
- *sin3* (Stamm SFC3)
 - Sin3 ist Komponente eines Histon-Deacetylase-Komplexes und ein Interaktionspartner von Efg1 (Tebarth *et al.*, 2003).
 - Wie die *sch9*-Mutante zeigte die *sin3*-Mutante auf YPS-Agar ein hyperfilamentöses Wachstum.
- *tup1* und *tcc1* (Stämme BCa2-10 und TCC103)
 - Tup1 ist ein transkriptioneller Repressor der Hyphenbildung, der zusammen mit Tcc1 einen Komplex bildet (Braun and Johnson, 1997; Kaneko *et al.*, 2006).
 - Beide Mutantenstämme zeigten einen hyperfilamentösen Phänotypen auf YPS-Agar, jedoch war dieser Phänotyp unabhängig von der CO₂-Konzentration (Daten nicht gezeigt).

- *bcr1* (Stamm CJN702)
 - *BCR1* kodiert für ein Zinkfinger-Protein, das für die Biofilmbildung benötigt wird (Nobile and Mitchell, 2005).
 - Üstün (2012) beobachtete bereits, dass eine *bcr1*-Mutante ein hyperfilamentöses Wachstum aufweist. Dies war auch bei Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit der Fall, jedoch kam es in der rekonstituierten Mutante (*bcr1* + *BCR1*, Stamm CJN698) ebenfalls zu einer starken Filamentierung auf YPS-Agar.

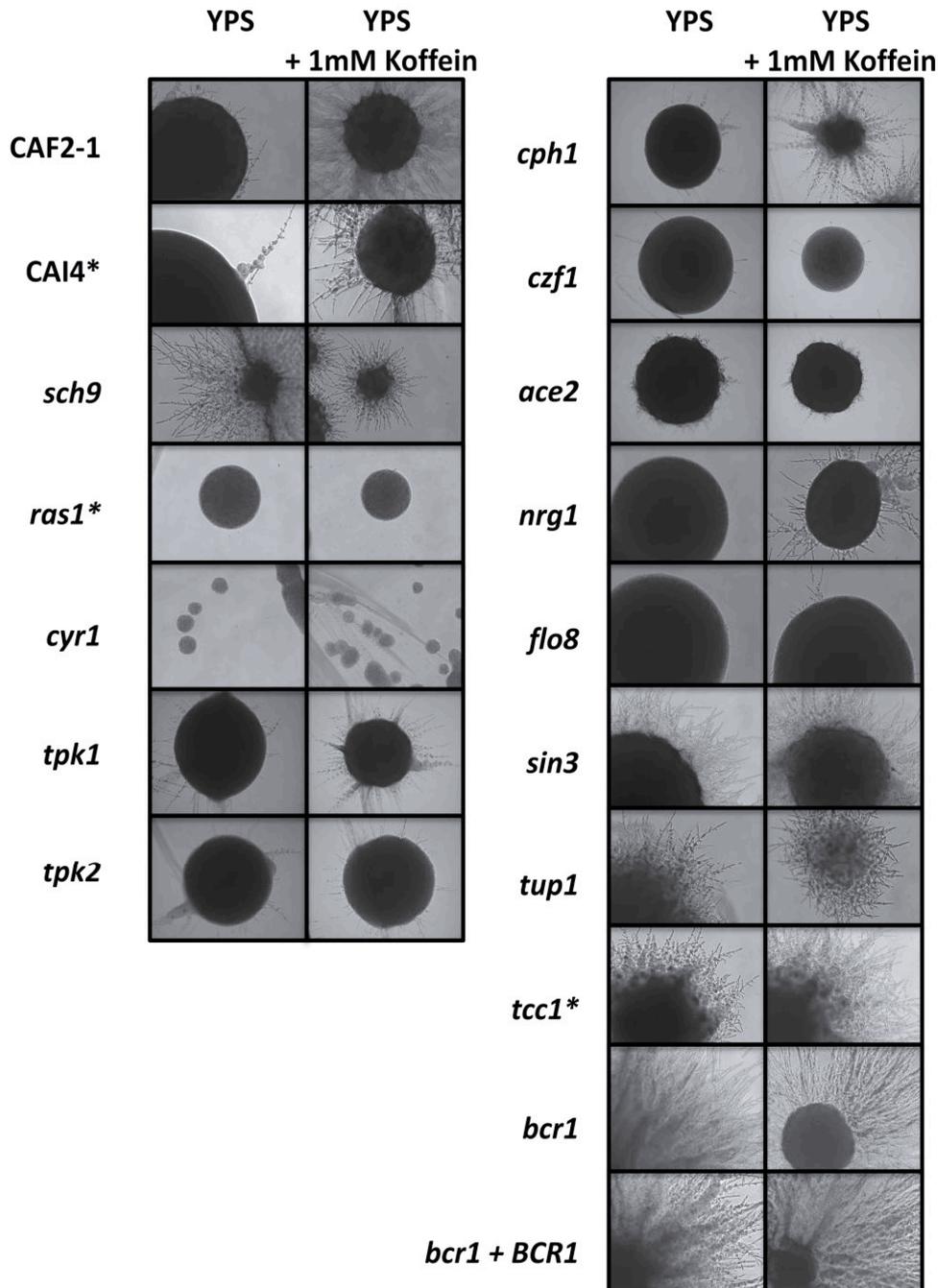


Abb. 3.30: Hyphenbildung verschiedener Stämme in An- und Abwesenheit von Koffein. Die Stämme CAF2-1 (WT), CAI4 (WT*), CCS3 (*sch9*), Can52 (*ras1**), CR216 (*cyr1*), HPY300U (*tpk1*), HPY400U (*tpk2*), JLC19 (*cph1*), CKY230 (*czf1*), MK106 (*ace2*), MMC3 (*nrg1*), CCF3 (*flo8*), SFC3 (*sin3*), BCa2-10 (*tup1*), TCC103 (*tcc1**), CJN702 (*bcr1*) und CJN698 (*bcr1*+*BCR1*) wurden auf YPS-Platten in An- und Abwesenheit von 1 mM Koffein ausplattiert. Nach 3 Tagen bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C wurde die Hyphenbildung beobachtet. * = Stämme mit *ura3/ura3*-Genotyp.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Komponenten des PKA-Signalweges für die Aufrechterhaltung der Hyphenbildung benötigt werden, wenn der Tor1-Sch9-Signalweg gehemmt wird. Die *ras1*-, *cyr1*-, *tpk1*- sowie die *tpk2*-Mutante weisen in Anwesenheit von Koffein keine oder zumindest eine verminderte Hyphenbildung auf. Ebenfalls scheinen die Transkriptionsfaktoren Czf1, Ace2, Flo8 und teilweise Nrg1 eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Hyphenbildung unter bestimmten hypoxischen Bedingungen zu spielen, da Koffein in den jeweiligen Mutanten keine Hyperfilamentierung auslösen konnte. Der hyperfilamentöse Phänotyp der *sin3*-Mutante auf YPS-Agar deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor einen reprimierenden Einfluss auf die Hyphenbildung unter den getesteten Bedingungen hat.

3.4.5 Einfluss von Farnesol auf den *sch9*-Phänotypen

Durch die Bildung eines Biofilms wird *C. albicans* widerstandsfähiger gegen Antimykotika, was zur Pathogenität des Pilzes beiträgt. Innerhalb dieses Systems ist die Bildung von Hyphen, die Regulation der Zelldichte sowie das „Quorum Sensing“ von großer Bedeutung (Ramage *et al.*, 2002). Der Sesquiterpenalkohol Farnesol ist ein „Quorum Sensing“-Molekül, das von *C. albicans* selbst produziert wird und die Hyphenbildung sowie die Biofilmbildung hemmt. Weiterhin ist bekannt, dass Farnesol die Hyphenbildung über den PKA-Weg inhibiert (Davis-Hanna *et al.*, 2008).

Es sollte nun untersucht werden, ob die Hyphenbildung in der *sch9*-Mutante über den PKA-Weg erfolgt. Dafür wurde der Wildtypstamm CAF2-1 sowie die *sch9*-Mutante (CCS3) auf YPS-Platten mit und ohne Farnesol ausplattiert und für 3 Tage bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C inkubiert.

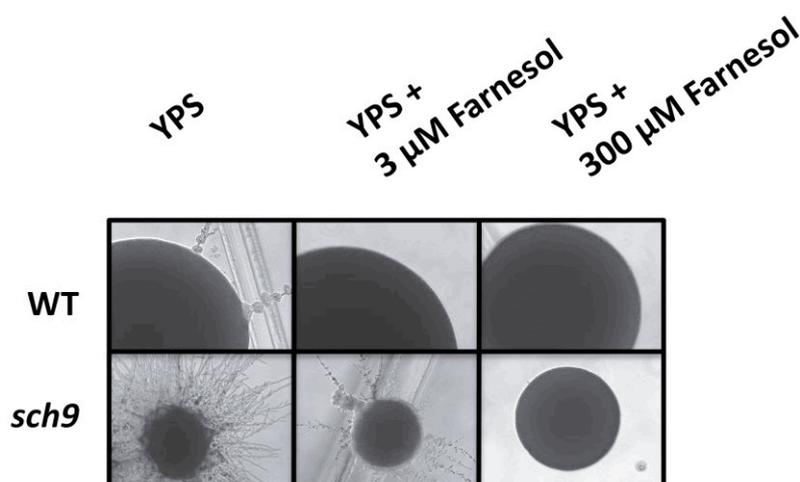


Abb. 3.31: Einfluss von Farnesol auf den *sch9*-Phänotypen. Die Stämme CAF2-1 (WT) und CCS3 (*sch9*) wurden auf YPS-Platten in An- und Abwesenheit von Farnesol ausplattiert. Nach 3 Tagen bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C wurde die Hyphenbildung beobachtet.

Auf YPS-Platten bildet der Wildtypstamm CAF2-1 unter den eben genannten Bedingungen wenige Hyphen aus (Abb. 3.31). Durch die Anwesenheit von 3 bzw. 300 μM Farnesol kommt es zu einem kompletten Verlust der Hyphenbildung. Dieses konnte ebenfalls bei der *sch9*-Mutante beobachtet werden. Bei Anwesenheit von 3 μM Farnesol war die Filamentierung bereits stark eingeschränkt; enthalten die Platten 300 μM Farnesol, waren keine Hyphen mehr zu beobachten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in einer *sch9*-Mutante der PKA-Signalweg für die Filamentbildung verantwortlich ist, wie es schon in der Mutationsanalyse (Abschnitt 3.4.4) vermutet wurde.

3.4.6 Suche nach weiteren Mutanten mit *sch9*-Phänotyp

Innerhalb ihrer Masterarbeit testete Üstün (2012) eine Sammlung von Kinase- und Transkriptionsfaktormutanten unter verschiedenen normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Dabei zeigte sich, dass es weitere Mutanten gibt, die unter hypoxischen Bedingungen, hohen CO_2 -Konzentrationen und 25 °C den Phänotypen der *sch9*-Mutante aufweisen. Ein Kandidat ist die Kinase Pbs2, die an der Stressantwort durch Regulation von Hog1 beteiligt ist. Hog1 ist Teil des HOG (high osmolarity glycerol)-Signalweges, der eine zentrale Rolle bei der Stressantwort von *C. albicans* spielt (Alonso-Monge *et al.*, 1999). Dabei aktiviert Pbs2 die Hog1-Kinase durch Phosphorylierung und steuert somit die osmotische und oxidative Stressantwort (Arana *et al.*, 2005). Su *et al.* (2013) vermuten, dass Hog1 ein basales Phosphorylierungslevel besitzt, welches durch den TOR-Signalweg beeinflusst werden kann (Abb. 3.32).

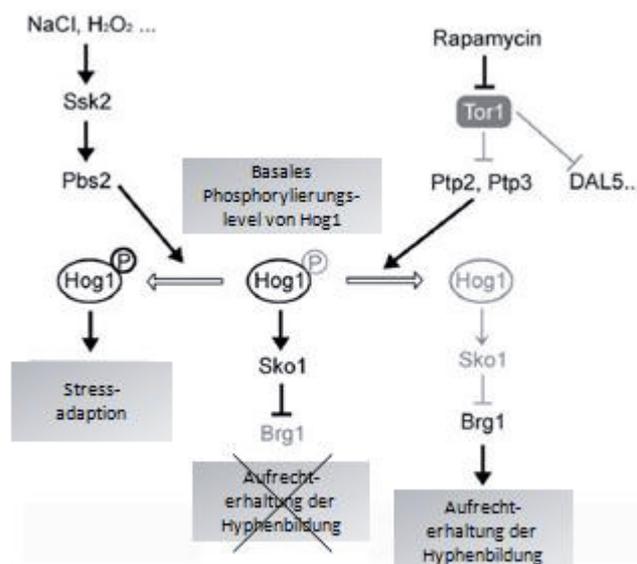


Abb. 3.32: Einfluss von Tor1 auf den HOG-Signalweg (Su *et al.*, 2013; modifiziert). Die Stressadaption und die Aufrechterhaltung der Hyphenbildung sind abhängig von dem Phosphorylierungslevel von Hog1. Tor1 hemmt dabei die Phosphatasen Ptp2 und Ptp3, welche eine basale Phosphorylierung von Hog1 verhindern.

Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass durch die Inhibierung von Tor1 durch Rapamycin die Phosphatasen Ptp2 und Ptp3 aktiv sind. Diese dephosphorylieren Hog1, was zu einer Verminderung der Hog1-Aktivität führt. Durch die fehlende Phosphorylierung ist Hog1 nicht mehr in der Lage Sko1, den Repressor von Brg1, zu aktivieren. Dies führt zur Aktivierung der Histon-Deacetylase Hda1, was eine verstärkte Ausbildung von Hyphen nach sich zieht. Um zu klären, ob die eben erwähnten Komponenten für die Ausbildung des *sch9*-Phänotyps benötigt werden, wurden die jeweiligen Mutantenstämme wie in Abschnitt 3.4.4 untersucht.

- *pbs2* (Stamm jjh31)
 - Die MAPK-Kinase Pbs2 aktiviert die MAP-Kinase Hog1 und spielt somit eine Rolle bei der Stressantwort (Arana *et al.*, 2005).
 - Wie Üstün (2012) bereits beobachten konnte, zeigte die *pbs2*-Mutante wie die *sch9*-Mutante auf YPS-Agar einen hyperfilamentösen Phänotypen.
- *ptp2*, *ptp3* und *ptp2 ptp3* (Stämme HLY4100, *ptp3*-deletant und HLY4101)
 - Ptp2 und Ptp3 sind Tyrosin-Phosphatasen, die eine Rolle in der Regulation der Hog1-Aktivität besitzen (Su *et al.*, 2013).
 - Eine Deletion von *PTP2* oder *PTP3* trägt nicht zu einer Ausbildung von Hyphen bei, werden jedoch beide Gene deletiert, kommt es zu einem Phänotypen, der der *sch9*-Mutante ähnelt.
- *hog1* (Stamm CNC13)
 - Die MAP-Kinase Hog1 ist die zentrale Komponente des HOG-Signalweges, der für die Regulation der Stressantwort verantwortlich ist (San José *et al.*, 1996).
 - Wie die *sch9*-Mutante zeigte die *hog1*-Mutante einen hyperfilamentösen Phänotypen.
- *sko1* (Stamm HZY2-1)
 - *SKO1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der bei Stress durch Hog1 aktiviert wird. Weiterhin ist Sko1 ein transkriptioneller Repressor der Hyphenbildung (Alonso-Monge *et al.*, 2010).
 - Wie der Wildtypstamm war die *sko1*-Mutante nicht in der Lage Hyphen auszubilden.
- *brg1* (Stamm TF022)
 - Der Transkriptionsfaktor Brg1 rekrutiert die Histon-Deacetylase Hda1 an hyphenspezifische Gene und wird für die Biofilmbildung benötigt (Lu *et al.*, 2012; Nobile *et al.*, 2012).
 - In Anwesenheit von Koffein zeigte die *brg1*-Mutante keine gesteigerte, sondern eine stark verminderte Hyphenbildung.
- *hda1* (Stamm NDH3)
 - *HDA1* kodiert für eine Histon-Deacetylase, welche die Hyphenbildung stimuliert (Zacchi *et al.*, 2010)
 - Die *hda1*-Mutante zeigte keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtypstamm.

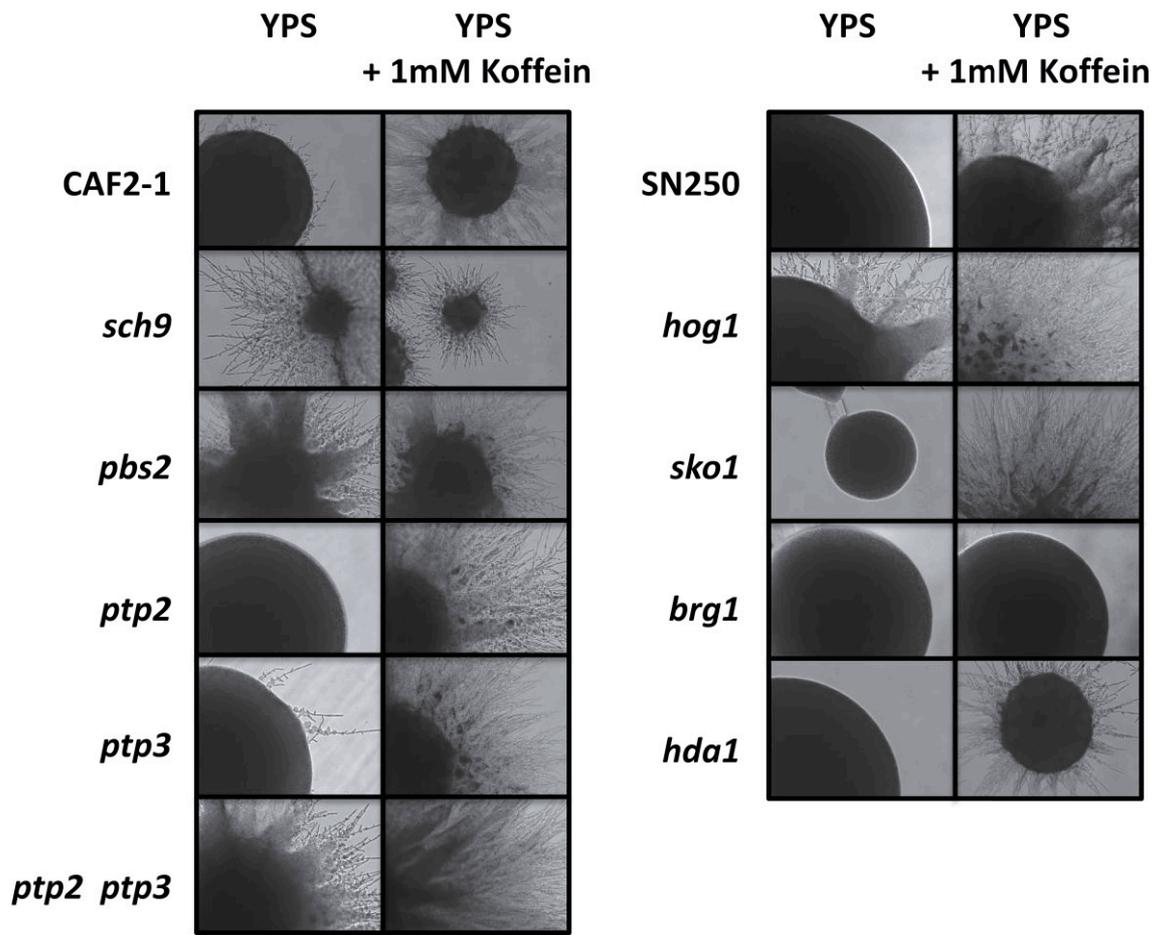


Abb. 3.33: Hyphenbildung verschiedener Stämme in An- und Abwesenheit von Koffein. Die Stämme CAF2-1 (WT), CCS3 (*sch9*), jjh31 (*pbs2*), HLY4100 (*ptp2*), HLY4101 (*ptp2 ptp3*), SN250 (WT), CNC13 (*hog1*), HZY2-1 (*sko1*), TF022 (*brg1*) und NDH3 (*hda1*) wurden auf YPS-Platten in An- und Abwesenheit von 1 mM Koffein ausplattiert. Nach 3 Tagen bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C wurde die Hyphenbildung beobachtet.

Die Ergebnisse deuten auf die reprimierenden Rollen von Pbs2 und Hog1 unter den getesteten Bedingungen hin. Weiterhin ist die gleichzeitige Anwesenheit der Phosphatasen Ptp2 und Ptp3 für die Repression der Hyphenbildung notwendig. Bei Inhibierung von Tor1 durch Koffein scheint die Aufrechterhaltung der Hyphenbildung durch Brg1 beeinflusst zu werden. Im Gegensatz zum Kontrollstamm (SN250) bildet eine *brg1*-Mutante in Gegenwart von Koffein keine Hyphen aus. Einen weiteren Hinweis auf die Rolle von Brg1 konnte durch den relativen Transkriptspiegel des Gens gefunden werden. Der Wildtypstamm CAF2-1 sowie die *sch9*-Mutante (CCS3) wurden unter hypoxischen Bedingungen, hohen CO₂-Konzentrationen und 25 °C in flüssigem YPS-Medium angezogen. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert (Abschnitt 2.6.4) und der Transkriptspiegel von *HOG1* sowie *BRG1* in jeweils 2 biologischen Replikaten ermittelt.

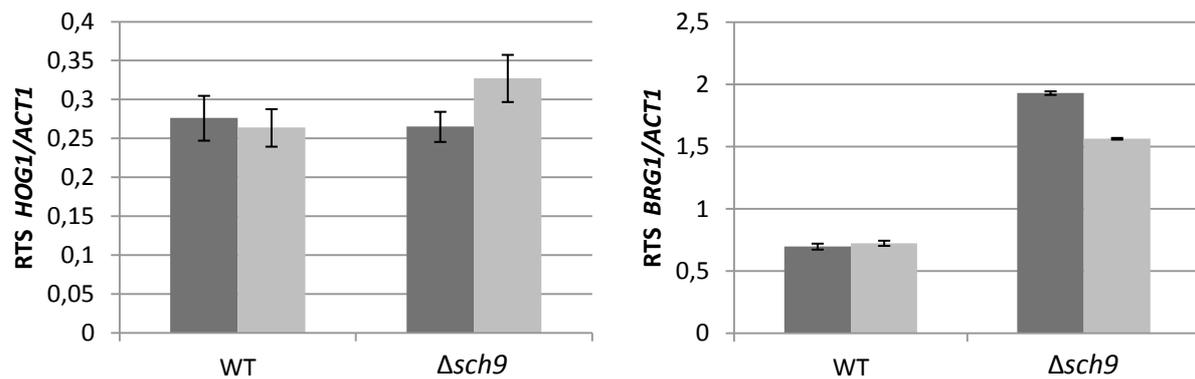


Abb. 3.34: Relative Transkriptspiegel von *HOG1* und *BRG1*. Die Stämme CAF2-1 (WT) und CCS3 ($\Delta sch9$) wurden unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C) in YPS-Medium angezogen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und der relative Transkriptspiegel von *HOG1* und *BRG1* mittels qPCR ermittelt. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate (dunkel- und hellgraue Balken) untersucht. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die drei technischen Replikate, die von jeder cDNA-Probe angefertigt worden sind.

In Abb. 3.34 wird gezeigt, dass es in der *sch9*-Mutante zu einer Hochregulation des *BRG1*-Transkriptspiegels kommt. Eine Veränderung des *HOG1*-Transkriptspiegels konnte unter den genannten Bedingungen nicht beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Brg1 eine stimulierende Rolle in der Ausbildung des hyperfilamentösen Phänotypen der *sch9*-Mutante hat.

3.4.7 Epistase-Untersuchungen zur Komplementation des *sch9*-Phänotyps

In Vorarbeiten wurde beobachtet, dass eine Überexpression von *TPK2* in einem *sch9*-Deletionsstamm zu einem Verlust der Hyphenbildung führt (C. Stichernoth, unveröffentlichte Daten). Epistase-Versuche können Hinweise geben, ob Komponenten des PKA- und des HOG-Signalweges in den Sch9-Signalweg involviert sind und, ob sie oberhalb oder unterhalb der Kinase im Signalweg agieren. Hierfür wurden Überexpressionsvektoren mit verschiedenen Genen in die *sch9*-Mutante (CAS4) transformiert. Jeweils 2 Transformanten wurden auf ihre Morphologie hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.35 dargestellt.

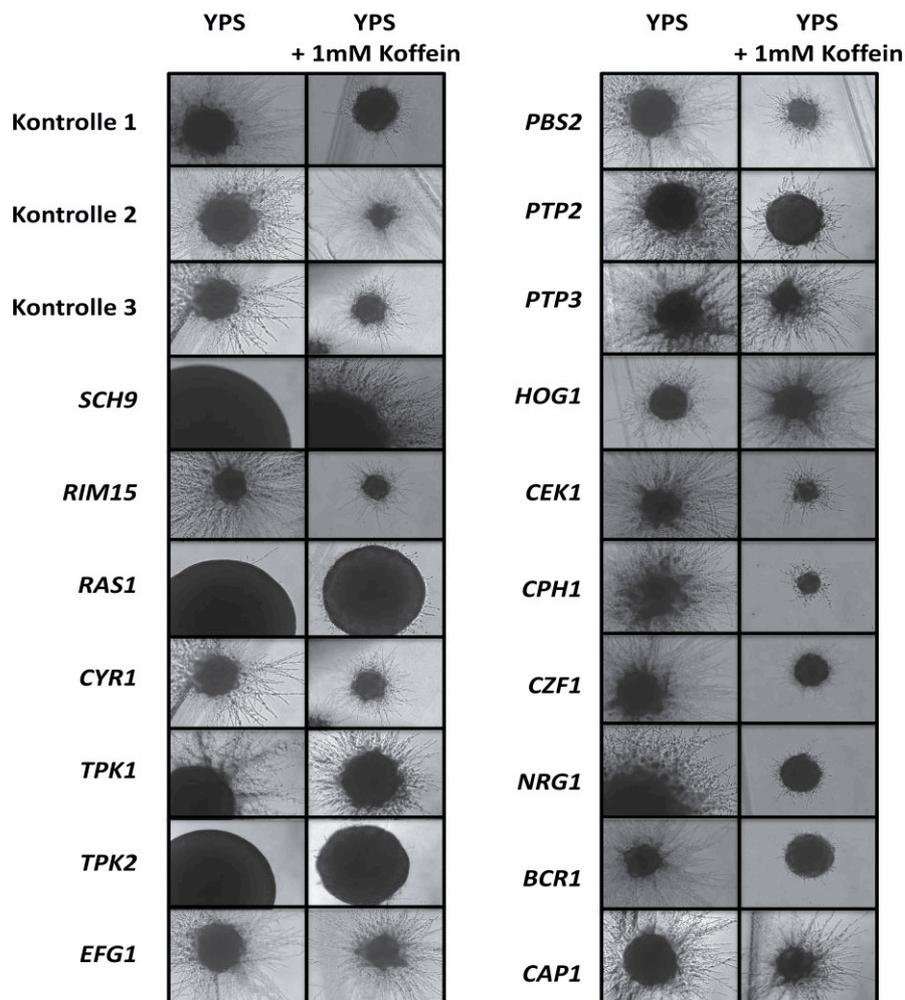


Abb. 3.35: Überexpression verschiedener Gene in einem *sch9*-Deletionsstamm. Die *sch9*-Mutante (*CAS4*) wurde mit den Plasmiden pDS1044-1 (Kontrolle 1), pRC2312 (Kontrolle 2), pSM2 (Kontrolle 3), p2297S9 (*SCH9*), p2297R1 (*RIM15*), pQF145.2 (*RAS1*), pTEF2-CYR1 (*CYR1*), p2297T1 (*TPK1*), p2297T2 (*TPK2*), p2297UE (*EFG1*), pACT1-PBS2-GFP (*PBS2*), pBES119-PTP2 (*PTP2*), pBES119-PTP3 (*PTP3*), pPCK1p-orf19.895 (*HOG1*), pPRDACT1CEK1 (*CEK1*), pLJ19 (*CPH1*), p2297C (*CZF1*), p576 (*NRG1*), pPRDACT1BCR1 (*BCR1*) und pPRDACT1CAP1 (*CAP1*) transformiert. Jeweils 2 Transformanten wurden auf YPS-Platten in An- und Abwesenheit von 1 mM Koffein vereinzelt und für 3 Tage bei 0,2 % O₂, 6 % CO₂ und 25 °C inkubiert.

Eine Überexpression von *TPK2* führte, wie von Stichternoth bereits beobachtet, zur Repression des *sch9*-Phänotyps. Der durch die Deletion von *SCH9* hervorgerufene hyperfilamentöse Phänotyp wurde ebenfalls durch die Überexpression von *RAS1* supprimiert. Eine Überproduktion von Efg1 oder der PKA-Isoform Tpk1 führt dagegen zu keiner Veränderung des Phänotyps. Ebenso gab es keine Veränderung bei Überexpression von *PBS2*, *PTP2*, *PTP3* oder *HOG1*. Die Kinase Cek1 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Cph1, jedoch war durch Überproduktion dieser Proteine ebenfalls kein Verlust der Hyphenbildung zu beobachten. Dies war ebenfalls bei Überproduktion der Proteine Czf1,

Nrg1, Bcr1 und Cap1 zu beobachten. Eine Komplementation des *sch9*-Phänotyps konnte somit nur durch eine Überexpression von *RAS1* oder *TPK2* beobachtet werden. Dieses unerwartete Ergebnis deutet darauf hin, dass möglicherweise ein intermediäres Level dieser Proteine notwendig ist, um die Hyphenbildung zu ermöglichen.

3.5 Suche nach neuen Interaktionspartnern von Sch9 in *C. albicans*

Bei *C. albicans* hat Sch9 eine wichtige Rolle bei der Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen, erhöhten CO₂-Konzentrationen und Temperaturen unter 37 °C. Da bisher keine Zielproteine von Sch9 in *C. albicans* bekannt sind, sollten diese mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und einer *C. albicans*-„Genbank“ gesucht werden.

Das Zwei-Hybrid-System aus *S. cerevisiae*

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist es möglich, Interaktionspartner eines bekannten Proteins in *S. cerevisiae* zu ermitteln. Dazu wurde in diesem Versuch der Transkriptionsfaktor Gal4 verwendet, welcher aus einer Binde (BD)- und einer Aktivierungsdomäne (AD) besteht. Die Bindedomäne interagiert mit der Upstream-Aktivatorsequenz (UAS), wodurch der Transkriptionsfaktor in die Nähe des Promotors für ein Reportergen gebracht wird. Die Aktivierungsdomäne löst andererseits den Transkriptionsstart aus. Sind die Gene der beiden Domänen auf zwei separaten Expressionsvektoren kodiert, können durch Genfusion Fusionsproteine erstellt werden, so dass ein Protein (X) mit der BD und ein anderes Protein (Y) mit der AD fusioniert ist. Nur wenn X und Y Interaktionspartner sind kommt es zu einer funktionellen Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors, welcher die Expression von Reportergenen (*lacZ*, *HIS3*, *ADE2*) einleitet.

In dieser Arbeit sollten neue Interaktionspartner von Sch9 gefunden werden. Dafür wurden jeweils zwei Plasmide kotransformiert. Als „Köder“ wurde ein Plasmid eingesetzt, das für ein Sch9-BD-Fusionsprotein kodiert. Auf dem anderen Plasmid waren zufällige Fragmente des gesamten *C. albicans*-Genoms („Genbank“) an die Sequenz der AD fusioniert. Das Plasmid mit der Sequenz, die für die BD kodiert, beinhaltet weiterhin einen Selektionsmarker für Tryptophan (*TRP1*), während das AD-Plasmid einen Leucin (*LEU2*)-Marker trägt. Dadurch konnte die erfolgreiche Transformation beider Plasmide gewährleistet werden.

Anwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden jeweils zwei Plasmide in den Stamm PJ69-4A transformiert (Abschnitt 2.5.4). Als Negativkontrolle wurden die Plasmide pGBD-C1 und pGAD-C1 zusammen transformiert, welche für die Gal4-Domänen ohne Fusionsprotein kodieren. Das Plasmid pCL2 wurde zusammen mit pBD-C1 transformiert. pCL2 beinhaltet die komplette Sequenz von *GAL4* und dient somit als Positivkontrolle. In dieser Arbeit sollten neue Interaktionspartner der Proteinkinase B Sch9 identifiziert werden. Dazu wurden genomische „DNA-Banken“ von *C. albicans* in Form der Plasmide pDYC-C1, pDYC-C2 und pDYC-C3 verwendet. Diese enthalten Fragmente des gesamten Genoms von *C. albicans* (0,5 bis 3 kb), welche an die Sequenz der AD gebunden sind und alle 3 Leseraster abdecken. Die Plasmide wurden jeweils mit dem Plasmid pWP9 transformiert, wobei hier Sch9 als „Köder“ an die BD des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert worden war.

Die Transformation erfolgte wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben. 10 % der Transformationsansätze wurden auf Platten ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert (SD -leu/-trp). Da dort nur Zellen überleben konnten, die beide Plasmide aufgenommen haben, dienten diese Platten als Kontrollen. Der restliche Ansatz wurde auf Platten inkubiert, die zusätzlich kein Adenin enthielten (SD -leu/-trp/-ade). Da es sich bei *ADE2* um ein Reporter-gen handelt, kam es in Kolonien, die auf diesen Platten gewachsen sind, zu einer Proteininteraktion zwischen Sch9 und einem unbekanntem Interaktionspartner. Diese Platten mussten bis zu einer Woche bei 30 °C inkubiert werden.

Tab. 3.3: Hefe-Zwei-Hybrid-System: Übersicht der verwendeten Plasmide und Anzahl der Transformanten.

BD-Plasmid	AD-Plasmid	Beschreibung	Anzahl der Kolonien		Transformations-effizienz (cfu/μg DNA)
			SD -leu/-trp	SD -leu/-trp/-ade	
pGBD-C1	pGAD-C1	Negativkontrolle	684	0	1710
pGBD-C1	pCL2	Positivkontrolle	1032	137	2580
pWP9	pGAD-C1	Selbstaktivierung	499	0	1247,5
pWP9	pDYC-C1	Genbanksuche	480	4	1200
pWP9	pDYC-C2	Genbanksuche	380	9	950
pWP9	pDYC-C3	Genbanksuche	375	2	937,5

Die aufgelisteten Plasmide wurden in den verschiedenen Kombinationen in den *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A kotransformiert. Von dem Transformationsansatz wurden 10 % auf SD -leu/-trp und 90 % auf SD -leu/-trp/-ade Platten ausplattiert. Nach ca. 1 Woche wurden die erhaltenen Kolonien gezählt und die Transformationseffizienz bestimmt. AD = Aktivierungsdomäne, BD = Bindedomäne.

In Tab. 3.3 sind die verwendeten Plasmidkombinationen sowie die Anzahl der Transformanten aufgelistet. Durch das Zählen der Kolonien auf SD -leu/-trp Platten wurde die Transformationseffizienz bestimmt. Die Berechnung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben.

Um eine Proteininteraktion zu bestätigen, wurde in den insgesamt 15 Transformanten, die auf SD -leu/-trp/-ade gewachsen sind, die Expression des Reportergens *lacZ* überprüft. Dies erfolgte mit einem qualitativen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay-Assay“, Abschnitt 2.7.7). Für die Negativkontrollen (Ansätze pGBD-C1 + pGAD-C1 sowie pWP9 + pGAD-C1) dienten Kolonien, die auf SD -leu/-trp gewachsen waren.

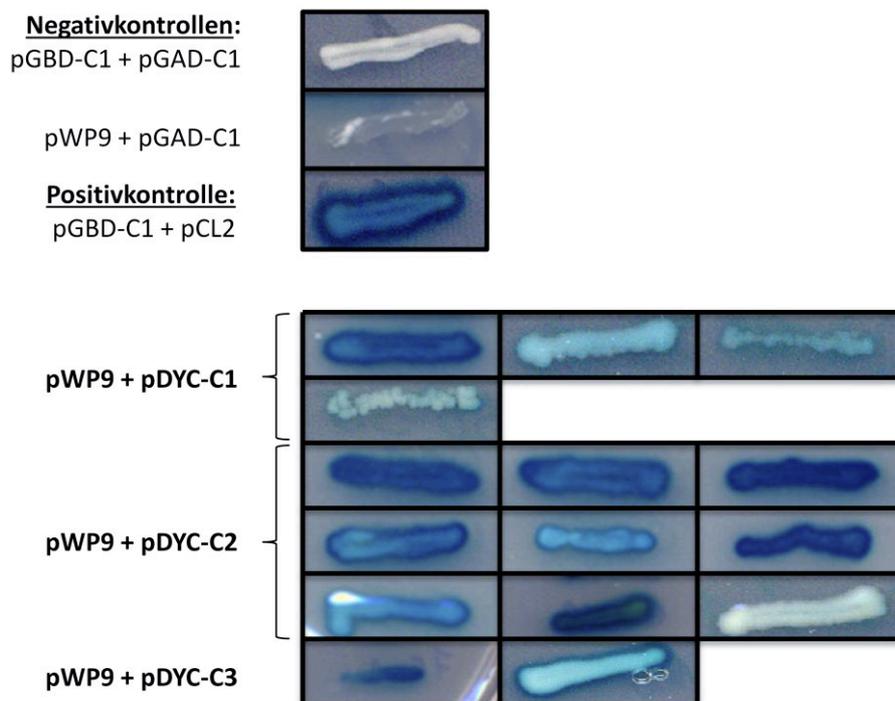


Abb. 3.36: X-Gal-overlay der Transformanten, die auf SD -leu/-trp/-ade gewachsen sind. Die Transformanten wurden auf SD -leu/-trp ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der X-Gal-overlay wie in Abschnitt 2.7.7 beschrieben. Die Negativkontrollen sind Kolonien, die auf SD -leu/-trp gewachsen sind.

Da alle 15 Transformanten im X-Gal-overlay eine Blaufärbung zeigten (Abb. 3.36), wurde mit allen Kolonien weitergearbeitet. Für die Identifizierung der Interaktionspartner von Sch9 mussten die Plasmide, wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben, isoliert werden. Anschließend wurden sie in elektrokompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Dadurch enthielten die *E. coli*-Zellen entweder das bekannte Plasmid pWP9 oder das „Bankplasmid“. Nach der Isolation

der Plasmide konnten mit Hilfe einer Restriktionsanalyse mit *Xma*I und *Eco*RV die Bankplasmide gezielt identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Letztendlich wurden die Bankplasmide unter Verwendung des Primers „Y2H hin“, welcher vor der multiple cloning site bindet, von der Firma SeqLab sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 9.1) und wurden einer BLAST-Analyse (<http://www.candidagenome.org>) unterzogen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Um die Protein-Protein-Interaktion zu verifizieren, wurde eine weitere Transformation durchgeführt. Dafür wurde das Plasmid pWP9 jeweils mit den 15 isolierten Bankplasmiden in den *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A kotransformiert. Kolonien, die auf SD -leu/-trp/-ade gewachsen sind, wurden erneut einem X-Gal-overlay unterzogen. Die Transformanten aller Ansätze zeigten erneut eine Blaufärbung (Daten nicht gezeigt). Um eine Selbstaktivierung auszuschließen, wurden die Bankplasmide außerdem jeweils mit dem Plasmid pGBD-C1 transformiert. Falls Transformanten auf SD -leu/-trp/-ade beobachtet wurden, wurden diese ebenfalls einem X-Gal-overlay unterzogen. Lediglich die Transformanten, die *CEM1*-Sequenzen enthielten, wiesen eine Aktivierung des Reportergens *lacZ* auf (Daten nicht gezeigt).

Anhand der Ergebnisse kann festgestellt werden, dass mögliche Interaktionspartner von Sch9 durch die Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems gefunden werden konnten. Interessanterweise wurde ein Interaktionspartner durch die Verwendung aller 3 Bankplasmide identifiziert: *ORF19.3533* ist in *C. albicans* noch nicht charakterisiert; das orthologe Gen in *S. cerevisiae* ist *EMI1*. Dieses Gen kodiert für ein Protein mit einem „Twin Cystein-x9-Cystein“ und wird für die Induktion des Transkriptionsfaktors Ime1 benötigt (Enyenihi und Saunders, 2003; Longen *et al.*, 2009).

Tab. 3.4: Ergebnisse der BLAST-Analyse der Bankplasmide.

Ursprung	Sequenzlänge (bp)	Übereinstimmung (bp)	Zuordnung	Genname	Mögliche Funktion
(1) pDYC-C1	1444	313/313 (100 %)	orf19.3533		nicht charakterisiert. Homolog in <i>S. cerevisiae</i> : <i>EMI1</i>
(2) pDYC-C1	1021	313/313 (100 %)	orf19.3533		nicht charakterisiert. Homolog in <i>S. cerevisiae</i> : <i>EMI1</i>
(3) pDYC-C1	1326	803/807 (99,5 %)	orf19.1915	<i>MPP10</i>	Mögliche Komponente des SSU-Prozessoms und 90S-Präribosoms
(4) pDYC-C1	1299	217/217 (100 %)	orf19.6719	<i>HIR3</i>	Mögliches Nukleosomen- Assemblierungs-Protein
(5) pDYC-C2	1404	583/640 (91,1 %)	orf19.728	<i>TSC11</i>	Protein ähnelt Tsc11 in <i>S. cerevisiae</i> (Untereinheit des TORC2-Komplexes)
(6) pDYC-C2	1364	457/483 (94,6 %)	orf19.5212		nicht charakterisiert. Homolog in <i>S. cerevisiae</i> : <i>CST9</i> (SUMO E3 Ligase)
(7) pDYC-C2	1308	110/110 (100 %)	orf19.5977	<i>CEM1</i>	Protein ähnelt Cem1 in <i>S. cerevisiae</i> (Acyl-Carrier- Protein)
(8) pDYC-C2	1428	110/110 (100 %)	orf19.5977	<i>CEM1</i>	Protein ähnelt Cem1 in <i>S. cerevisiae</i> (Acyl-Carrier- Protein)
(9) pDYC-C2	1005	313/313 (100 %)	orf19.3533		nicht charakterisiert Homolog in <i>S. cerevisiae</i> : <i>EMI1</i>
(10) pDYC-C2	953	787/809 (97,3 %)	orf19.3999		nicht charakterisiert
(11) pDYC-C2	1006	899/905 (98,3 %)	orf19.6011	<i>SIN3</i>	Protein ähnelt Sin3 in <i>S. cerevisiae</i> (Komponente des Histon-Deacetylase- Komplexes)
(12) pDYC-C2	929	831/831 (100 %)	orf19.1891	<i>APR1</i>	Vakuoläre Aspartatprotease
(13) pDYC-C2	1005	155/155 (100 %)	orf19.3409	<i>SEC12</i>	Möglicher GTP- Austauschfaktor
(14) pDYC-C3	1219	313/313 (100 %)	orf19.3533		nicht charakterisiert. Homolog in <i>S. cerevisiae</i> : <i>EMI1</i>
(15) pDYC-C3	1275	383/387 (99%)	orf19.3328		nicht charakterisiert. Homolog in <i>S. cerevisiae</i> : <i>HOT1</i>

4 Diskussion

C. albicans gehört zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen. Es handelt sich um einen opportunistischen Erreger, der bei gesunden Menschen als Kommensale den Gastrointestinal- und Oraltrakt besiedelt und durch das Immunsystem abgewehrt werden kann. Kommt es jedoch zu einer Abschwächung des Immunsystems können oberflächliche Hautinfektionen oder aber lebensbedrohliche systemische Mykosen entstehen (Odds, 1988). Die Fähigkeit des Pilzes verschiedene morphologische Formen anzunehmen ist maßgeblich für seine Virulenz. Dabei spielt der Wechsel zwischen der Hefe- und Hyphenform, der auch als Dimorphismus bezeichnet wird, die größte Rolle. Als Hefezelle kann sich der Pilz über den Blutstrom verbreiten, während die Bildung von Hyphen der Adhäsion, Penetration und Invasion von Wirtszellen dient (Kumamoto und Vines, 2005). Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die für den Dimorphismus verantwortlich sind, kann zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten führen.

Es ist bekannt, dass in *C. albicans* die AGC-Kinasen Tpk1, Tpk2 und Sch9 beim Wechsel zwischen der Hefe- und Hyphenform bedeutende Rollen spielen. Die katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), Tpk1 und Tpk2, aktivieren den zentralen Transkriptionsfaktor Efg1 durch Phosphorylierung und steuern somit den Dimorphismus (Bockmühl und Ernst, 2001). Da *C. albicans* verschiedene Nischen im menschlichen Körper besiedelt, sind Experimente unter reduzierten Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) von großer Bedeutung. Es wird angenommen, dass die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen von einem alternativen Signalweg gesteuert wird. Die Proteinkinase B Sch9 scheint Teil dieses Signalweges zu sein, da eine *sch9*-Mutante unter hypoxischen Bedingungen, erhöhten CO₂-Konzentrationen und Temperaturen < 37 °C einen hyperfilamentösen Phänotypen ausweist (Stichthernoth, 2009).

Die Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, haben neue Erkenntnisse über die Funktionen der AGC-Kinasen in *C. albicans* gebracht. Mit Hilfe von CHIP-chip-Analysen konnten genomweite Zielsequenzen der PKA sowie von Sch9 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen identifiziert und analysiert werden.

Vorarbeiten zeigten, dass Sch9 unter bestimmten Bedingungen (O₂-Konzentrationen < 10 %, CO₂-Konzentrationen > 1 %, Temperaturen < 37 °C) ein Repressor der Hyphenbildung ist (Stichthernoth, 2009). Innerhalb dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob in *C. albicans* eine Tor1-Sch9-Rim15-Kaskade existiert. Durch die Konstruktion einer *sch9 rim15* -

Doppelmutante und Verwendung von TOR-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass eine Tor1-Sch9-Kaskade für die Regulation der Hyphenbildung unter bestimmten hypoxischen Bedingungen verantwortlich ist. Zusätzlich konnten durch Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems potentielle Interaktionspartner von Sch9 identifiziert werden.

4.1 Zelluläre Lokalisation der AGC-Kinasen

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Lokalisation der HA-Epitop-markierten AGC-Kinasen aus *C. albicans* mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 3.7). Es zeigte sich, dass die Komponenten der PKA, unabhängig von den Wachstumsbedingungen, hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Nur im Falle von Tpk2 konnte ein Teil des Proteins am Rande der Zellkernhülle beobachtet werden. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Kinasen ist eine partielle Lokalisation im Zellkern denkbar, die nicht durch Fluoreszenzmikroskopie detektierbar ist. Für die PKA ist bekannt, dass ihre zelluläre Lokalisation speziesspezifisch ist. Während sich die PKA bei *S. cerevisiae* im Zellkern befindet, wurde in der Spaltheefe *S. pombe* sowie in Säugern eine Lokalisation der Kinase im Zytoplasma beobachtet (Griffioen *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2008; Beene und Scott, 2007). Tpk1 aus *S. cerevisiae* ist weiterhin zusammen mit Bcy1 im Kern lokalisiert und wird erst durch die Bindung von cAMP an Bcy1 in das Zytoplasma freigesetzt (Griffioen *et al.*, 2000). Für Tpk1 aus *C. albicans* zeigten Cassola *et al.* (2004), dass ein Tpk1-GFP-Fusionsprotein im Zellkern lokalisiert ist. Dabei wurde Tpk1 im Wildtypstamm und nicht, wie in dieser Arbeit, in einer heterozygoten Mutante mit dem Fusionsprotein markiert. Die Funktion der Tpk1-GFP-Fusion wurde jedoch nicht bewiesen, weshalb diese Lokalisationsdaten mit Vorsicht zu bewerten sind. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die AGC-Kinasen aus *C. albicans* Aufgaben im Zellkern erfüllen. Eine zumindest partielle Lokalisation der PKA im Zellkern scheint außerdem gegeben zu sein, da durch CHIP-chip-Analysen innerhalb dieser Arbeit chromosomale Bindestellen der PKA identifiziert wurden.

Im Falle von Sch9 konnte durch die Fluoreszenzmikroskopie eine Lokalisation im Zytoplasma, aber nicht im Zellkern, von *C. albicans* beobachtet werden. Die CHIP-chip-Analysen zeigten jedoch eine Assoziation des Proteins mit allen Zentromerregionen und der rDNA, was dafür spricht, dass ein gewisser Anteil von Sch9 im Zellkern agiert. Dieses Ergebnis stimmt mit der Lokalisation des Proteins in *S. cerevisiae* überein, da bekannt ist, dass Sch9 ein Chromatin-

assoziiertes Aktivator von Genen der Osmostress-Antwort ist (Pascual-Ahuir und Proft, 2007).

Um Hinweise auf die zelluläre Lokalisation der Kinasen auf bioinformatischer Ebene zu erhalten, wurden die Proteinsequenzen von Tpk1, Tpk2, Bcy1 und Sch9 auf Im- und Exportsignale analysiert. Dabei ist zu beachten, dass Proteine, die größer als ca. 60 kDa sind, nicht durch Diffusion durch die Kernporen gelangen können, sondern aktiv transportiert werden müssen. Für einen aktiven Im- und Export werden Kernlokalisierungssequenzen („nuclear location signal“, NLS) bzw. Exportsignale („nuclear export signal“, NES) benötigt (Moroianu, 1998). NLS sind Abfolgen von basischen Aminosäuren (insbesondere Lysin), die aus einem einzelnen oder einem zweigeteilten Signal (mono- und bipartite) bestehen können (Kalderon *et al.*, 1984; Dingwall *et al.*, 1988). NES hingegen sind kurze Leucin-reiche Sequenzen (la Cour *et al.*, 2004). Für die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins ist ein Gleichgewicht zwischen NLS und NES entscheidend (Nguyen *et al.*, 2002).

Mit Hilfe der Programme „cNLS Mapper“ (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi; Kosugi *et al.*, 2009) und „NES Finder“ (<http://research.nki.nl/fornerodlab/NES-Finder.htm>) wurde nach möglichen NLS und NES innerhalb der Proteinsequenzen der Kinasen gesucht (Tabelle 4.1). Für Tpk1 und Tpk2 konnte jeweils eine mögliche monopartite NLS-Sequenz gefunden werden. Bcy1 besitzt zwei und Sch9 vier potentielle bipartite NLS-Sequenzen. Es wurde jedoch durch cNLS Mapper vorhergesagt, dass alle Proteine im Zytoplasma vorliegen, da die „scores“ der Sequenzen unterhalb eines Schwellenwertes für die Kernlokalisierung liegen. Tpk1 besitzt weiterhin zwei mögliche NES-Signale, während Tpk2, Bcy1 und Sch9 jeweils eine Signalsequenz für den Export tragen.

Durch die Daten der bioinformatischen Analyse ist es eher unwahrscheinlich, dass die AGC-Kinasen durch aktiven Transport in den Zellkern gelangen. Möglicherweise könnten die molekularen Massen von Tpk1 (46,7 kDa), Tpk2 (50,7 kDa) und Bcy1 (50,2 kDa) dazu führen, dass diese Proteine getrennt voneinander in den Zellkern diffundieren. Denkbar wäre auch, dass die Kinasen durch Bindung an ein aktiv transportiertes Protein (z.B. einen Transkriptionsfaktor) in den Kern gelangen. Hinweise dazu liefern ebenfalls die ChIP-chip-Analysen: Die drei Proteine zeigten Unterschiede in der chromosomalen Lokalisation, was darauf hindeutet, dass es nicht zu einer Bindung an das Genom in Form eines PKA-Holoenzym kommt.

Tab. 4.1: Vorhergesagte NLS und NES der AGC-Kinasen.

Protein	score	Sequenz (NLS)
Tpk1	2	KVLKKQRVV
Tpk2	2,5	MVNLLKKLHIT
Bcy1	2,9	LQKEIISKNPQDVLQFCANYFNTKLQA
	2	TLGKSGFQRLGPPVVEVLKEQDPTKSQDPT
Sch9	2	FGNYKKESSLQSPTPPPSAHSSSEQHHSNTE
	2,9	NYKKESSLQSPTPPPSAHSSSEQHHSNTEE
	2,2	GHIKIKWEYTSFDNNIKRSYGP
	2,7	RNPKHLRGATDDARELKAHPF

Protein	Sequenz (NES)
Tpk1	SIRSLNDINL
	AIEYLHSLDI
Tpk2	MVNLLKKLHI
Bcy1	VCWALDRLTF
Sch9	KMVDVFWSLGV

Dargestellt ist die Anzahl und die Sequenz der vorhergesagten NLS durch das Programm "cNLS Mapper" sowie NES durch „NES Finder“. Jeder NLS wird ein score (1-10) zugewiesen, der vorhersagt in welchem Kompartiment sich das Protein wahrscheinlich befindet. Dabei steht ein score von 1-2 für eine Lokalisation im Zytoplasma und ein score von 8-10 besagt, dass das untersuchte Protein wahrscheinlich ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (Kosugi *et al.*, 2009).

Aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie sowie den Daten der bioinformatischen Analyse lässt sich daher schlussfolgern, dass die AGC-Kinasen hauptsächlich im Zytoplasma und nur teilweise im Zellkern lokalisiert sind. Da es innerhalb dieser Arbeit möglich war, genomweite Bindesequenzen der Kinasen zu ermitteln, kann angenommen werden, dass die Kinasen auch Funktionen im Zellkern wahrnehmen. Hierbei ist es unklar, ob die Kinasen passiv durch Diffusion oder durch einen aktiven Transport in den Zellkern gelangen.

4.2 Tpk1 und Tpk2 haben chromosomale Binderegionen unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen

Vorangehende Untersuchungen in *S. cerevisiae* hatten die Assoziation der MAP-Kinasen Hog1, Fus3, Kss1 sowie zwei der drei PKA-Isoformen an Zielgene ihrer Signalwege gezeigt (Pokholok *et al.*, 2006). Um zu klären, ob Kinasen in *C. albicans* ebenfalls genomweite Binderegionen besitzen, wurde in dieser Arbeit die ChIP-chip-Methode angewendet. Durch den Einsatz dieser Methode konnten für die Isoformen der katalytischen (Tpk1 und Tpk2) sowie für die regulatorische Untereinheit der PKA (Bcy1) Binderegionen auf allen acht Chromosomen von *C. albicans* unter Hefewachstums- bzw. Hypheninduktionsbedingungen gefunden werden (siehe Anhang, Tabellen 9.1 bis 9.5). Bei pathogenen Pilzen ist dieses

Ergebnis der erste Nachweis einer Assoziation von Kinasen an genomische Bereiche. Dadurch konnten neue potentielle Zielgene der Kinasen und somit auch des PKA-Signalweges gefunden werden.

Es zeigte sich, dass die beiden Isoformen der katalytischen Untereinheit der PKA (Tpk1 und Tpk2) unterschiedliche Binderegionen und -muster besitzen und, dass diese zusätzlich von den Wachstumsbedingungen abhängen. Tpk1 und Tpk2 besitzen nur wenige gemeinsame Zielgene unter den beiden getesteten Wachstumsbedingungen. Tpk1 hat 30 min nach Hypheninduktion komplett andere Binderegionen und somit Zielgene, als unter Hefewachstumsbedingungen. Im Gegensatz dazu konnte für Tpk2 gezeigt werden, dass diese Kinase 32 Gene in der Hefe- und der Hyphenform regulieren könnte. Weiterhin erbrachte die ChIP-chip-Analyse die Erkenntnis, dass Tpk1 und Tpk2 unter Hefewachstumsbedingungen hauptsächlich innerhalb von kodierenden Regionen lokalisiert sind (45,8 % bzw. 49,3 %), während an diesen Regionen unter Hypheninduktionsbedingungen nur noch wenige Bindestellen vorhanden sind (2,6 % bzw. 8,8 %). Unter diesen Bedingungen sind die Isoformen verstärkt außerhalb von kodierenden Bereichen (Promotorregionen) zu finden (39,5 % bzw. 57,4 %).

Unter Zuhilfenahme des Gen-Ontologie (GO)-Analyseprogramms (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) und in Zusammenarbeit mit Prashant Desai wurde nach signifikanten, gemeinsamen Kategorien der Gene gesucht, die eine PKA-Bindestelle in ihrer kodierenden Region oder Stromaufwärts-Region beinhalten. Im Falle von Tpk1 konnten keine gemeinsamen GO-Kategorien für die Gene gefunden werden, während die Zielgene von Tpk2 unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen in die Überkategorien „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“ eingeteilt werden konnten (Tabelle 4.2).

Unter Hefewachstumsbedingungen wurden Gene gebunden, die für Transkriptionsfaktoren des Kohlenstoffmetabolismus kodieren (z.B. Rca1, Snf5, Tup1). Tpk2-Bindestellen wurden außerdem in Genen gefunden, die für Komponenten der MAPK-Kaskade kodieren (Cek1, Msb2). Gemeinsam mit dem PKA-Signalweg reguliert die MAPK-Kaskade das Hyphenwachstum (Lo *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 2000). Der Einfluss von Tpk2 auf die Expression von Genen der MAPK-Kaskade könnte eine bessere Regulation der Hyphenbildung ermöglichen.

30 min nach Hypheninduktion bindet Tpk2 verstärkt an Promotorregionen von Genen, die das filamentöse Wachstum regulieren (40 Gene; z.B. *BRG1*, *HGC1*, *RAS1*). Weiterhin kodieren 20 Zielgene von Tpk2 für Transkriptionsfaktoren, wobei viele von ihnen Zinkfinger-Motive enthalten (z.B. *Zcf3*, *Zcf7*, *Zcf20*, *Zcf21*, *Zcf23*). Die Tatsache, dass es sich bei den bereits charakterisierten Genen hauptsächlich um Transkriptionsfaktoren handelt, die Einfluss auf das filamentöse Wachstum haben, gibt Hinweise auf die Funktion der bisher noch uncharakterisierten ORFs, die von Tpk2 gebunden werden.

In Vorarbeiten wurden CHIP-chip-Analysen für den Transkriptionsfaktor Efg1 angefertigt (Lassak *et al.*, 2011). Da vermutet wird, dass die PKA-Isoformen Efg1 regulieren, wäre es denkbar, dass die Proteine ähnliche Zielgene besitzen. Die Tpk2-Zielgene, die einer GO-Kategorie zugeordnet werden konnten, wurden dahingehend untersucht, ob es sich dabei auch um Efg1-Zielgene handelt (Tabelle 4.2). Besonders unter Hypheninduktionsbedingungen zeigte sich, dass viele Zielgene von Tpk2 ebenfalls von Efg1 unter Hefewachstums- (Lassak *et al.*, 2011), Hypheninduktions- (Lassak *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2008) oder Biofilm-induzierenden Bedingungen (Nobile *et al.*, 2012) gebunden werden. Es fiel außerdem auf, dass viele Zielgene von Tpk2 mit denen der NAD-abhängigen Histon-Deacetylase Set3 (Hnisz *et al.*, 2012) korrelieren, wobei Set3 hauptsächlich an den ORFs der Gene lokalisiert ist. Interessanterweise bindet Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen auch an den Promotor des *SET3*-Gens und könnte dadurch die Transkription des Gens regulieren. Die Tpk2-Zielgene, die ebenfalls Efg1- und/oder Set3-Bindestellen besitzen, wurden in Tabelle 4.2 markiert.

Tab. 4.2: Gen-Ontologie (GO)-Zuordnung der Gene, die unter Hefewachstums- (A) oder Hypheninduktionsbedingungen (B) mit Tpk2-Binderegionen assoziiert sind.

A. Hefewachstumsbedingungen

GO-Überkategorie	GO-Kategorie	Gene ¹
Biologischer Prozess	Positive Regulation biologischer Prozesse	<i>ANB1 ASF1 CAT8* CEK1^{e*} CST20* CTA26^{de} CTA3 DEF1^{acde*} EFG1^{acde*} ORF19.676 MSB2^{c*} NOT3* PDC2 RCA1* RIM8* SBA1^{de} SFL1^{b*} SHA3^{acde*} SNF5* SPT5* SPT6* SWI1* YVH1* ZCF10 ZCF31 ORF19.2664 ORF19.3080 ORF19.3328 ORF19.4906 ORF19.5459</i>
	Positive Regulation makromolekularer, metabolischer Prozesse	<i>ANB1 ASF1 CAT8* CST20* CTA26^{de} CTA3 EFG1^{acde*} NOT3* PDC2 RCA1* SBA1^{de} SFL1^{cb*} SHA3^{acde} SNF5* SPT5* SPT6* SWI1* ORF19.2664 ORF19.3328 ORF19.4906 ORF19.5459</i>
	Kohlenstoffkatabolismus-abhängige Regulation der Transkription	<i>CAT8* RCA1* SNF5* SPT6* SWI1* TUP1^{bde*}</i>

B. Hypheninduktionsbedingungen

GO-Überkategorie	GO-Kategorie	Gene ¹
1. Biologischer Prozess	Zellwachstum	<i>AAF1^{ac*} ACT1^{de*} ADA2* AHR1^{a*} BGL2 BNA4* BNI4* BRG1^{de*} CLN3^{ac*} DUR3* ERG5* HGC1^{e*} HWP1^{ce*} IRO1^{b*} LPD1* MSB2^{c*} MYO2* OSH3* PGA59^{de*} PHR2* PMT1* PTP1* RAS1^{b*} RFX2* RIM101^{cde*} ROB1^{de*} RPL6* SET3* SFL1^{c*} SHA3^{acde*} SHE3* SOG2* SPT3* SSN6^{cde*} STP2^{cde*} STP4^{de*} TPS2^{de*} VPS21* VPS41^{c*} ZCF7* ORF19.4597 ORF19.6874</i>
	filamentöses Wachstum	<i>AAF1^{ac*} ACT1^{de*} ADA2* AHR1^{a*} BNA4* BNI4* BRG1^{de*} CLN3^{ac*} DUR3* ERG5* HGC1^{e*} IRO1^{b*} LPD1* MSB2^{c*} MYO2* OSH3* PGA59^{de*} PHR2* PMT1* PTP1* RAS1^{b*} RFX2* RIM101^{cde*} ROB1^{de*} RPL6* SET3* SFL1^{c*} SHA3^{acde*} SHE3* SOG2* SPT3* SSN6^{cde*} STP2^{cde*} STP4^{de*} TPS2^{de*} VPS21* VPS41^{c*} ZCF7* ORF19.4597 ORF19.6874</i>
	Zellkommunikation	<i>AHR1^{a*} ARF2 BNA4* BNI4* BRG1^{de*} DHH1 DUR3* ERG5 GAL4^{de} KIS2^c MSB2^{c*} PMT1* RAS1^{b*} REG1 RIM101^{cde*} RPL6 RTS1 SET3* SHA3^{acde*} SHE3* SOG2* SOK1^c TPS2^{de*} VPS21* VPS41^{c*} ZCF20 ORF19.1142 ORF19.177 ORF19.1994 ORF19.2726 ORF19.3936 ORF19.4488</i>
	Regulation des filamentösen Wachstums	<i>AHR1^a BRG1^{de*} CLN3^{ac*} HGC1^{e*} MSB2^{c*} MYO2* RAS1^{b*} RFX2* RIM101^{cde*} ROB1^{de*} SET3* SFL1^{c*} SPT3* SSN6^{cde*} STP2^{cde*} ZCF7*</i>
	Multiorganismen Prozess	<i>AAF1^{ac*} ADA2* AHR1^{a*} BGL2 BRG1^{de*} CRZ2^{ac} DHH1 ECE1^{ce*} FCR3^c GPM1 HGC1^{e*} HWP1^{ce*} HYR1^{c*} IRO1* OSH3* PHR2* PMT1* RAS1^{b*} RBT1 RBT4 RFX2* RIM101^{cde*} ROB1^{de*} SET3* SFL1^{c*} SHE3* SPT3* SSN6^{cde*} TPS2^{de*} VPS21*</i>

2. Molekulare Funktion	Nukleinsäurebindung; Transkriptionsfaktor-Aktivität	<i>ADA2</i> [*] <i>AHR1</i> ^{a*} <i>BRG1</i> ^{de*} <i>CRZ2</i> ^{ac} <i>FCR3</i> ^c <i>GAL4</i> ^{de} <i>RFX2</i> [*] <i>RIM101</i> ^{cde*} <i>ROB1</i> ^{de*} <i>SFL1</i> ^{c*} <i>STP2</i> ^{cde*} <i>STP4</i> ^{de*} <i>ZCF20</i> <i>ZCF21</i> <i>ZCF23</i> <i>ZCF7</i> [*] <i>ORF19.2743</i> <i>ORF19.3328</i> <i>ORF19.4125</i> <i>ORF19.4972</i>
	Sequenzspezifische DNA-Bindung; Transkriptionsfaktor-Aktivität	<i>AHR1</i> ^{a*} <i>GAL4</i> ^{de} <i>RIM101</i> ^{cde*} <i>ROB1</i> [*] <i>STP2</i> ^{cde*} <i>ZCF20</i> <i>ZCF21</i> <i>ZCF23</i> <i>ZCF3</i> [*] <i>ZCF7</i> [*] <i>ORF19.2743</i> <i>ORF19.3328</i>

¹Rot markiert: Bindung von Tpk2 innerhalb des ORFs; blau markiert: Bindung von Tpk2 am Promotor und ORF; schwarz markiert: Bindung von Tpk2 am Promotor. ^{a,b,c} Efg1 bindet an Promotorregion unter ^aHefewachstums-, ^bHypheninduktionsbedingungen oder während der ^cBiofilmbildung (Lassak *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2008; Nobile *et al.*, 2012). ^{d,e} Set3-Bindung unter ^dHefewachstums- oder ^eHypheninduktionsbedingungen (Hnisz *et al.*, 2012). *Gene, die während des filamentösen Wachstums hochreguliert sind (Arnaud *et al.*, 2005; Nantel *et al.*, 2002).

Die Analyse des Bindeverhaltens der PKA-Isoformen lässt folgenden funktionellen Ablauf vermuten: Entsprechend ihrer Funktionen sind die Kinasen unter Hefewachstumsbedingungen an verschiedenen kodierenden Regionen lokalisiert. Wird das Hyphenwachstum induziert, ändert sich das Bindemuster und die Kinasen sind verstärkt an Promotorregionen lokalisiert. Im Falle von Tpk2 handelt es sich hierbei um Gene, die das filamentöse Wachstum regulieren. Dies könnte bedeuten, dass Tpk2 die Hyphenbildung nicht nur durch die Aktivierung von Efg1 reguliert, sondern auch durch die (in)direkte Regulation von Genen, die am filamentösen Wachstum beteiligt sind. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Gene, deren Expression während des filamentösen Wachstums induziert wird. Weiterhin konnte für viele der von Tpk2 gebundenen Gene gezeigt werden, dass Efg1 in ihrer Promotorregion bindet, was die Vermutung zulässt, dass diese Gene einer Ko-Regulation von Tpk2 und Efg1 unterliegen. Da viele der Tpk2-Zielgene eine Set3-Bindestelle in ihrem ORF besitzen, kann zusätzlich eine gemeinsame Regulation der Gene mit Set3 vermutet werden.

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit, dass die katalytischen Untereinheiten der PKA durch ihre regulatorische Untereinheit Bcy1 an Zielgene rekrutiert werden, untersucht. Dies erschien möglich, da in *S. cerevisiae* Tpk1 zusammen mit Bcy1 im Kern lokalisiert ist und Tpk1 erst nach Aktivierung der PKA durch die Bindung von cAMP an Bcy1 in das Zytoplasma gelangt (Griffioen *et al.*, 2000). Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *C. albicans* Bcy1 ein komplett anderes Bindemuster als Tpk1 und Tpk2 besitzt. Dies bedeutet, dass die katalytischen Untereinheiten unabhängig von der regulatorischen Untereinheit

genomweite Bindestellen einnehmen. Es kommt nicht zu einer Bindung des PKA-Holoenzym an Zielgene der PKA. Letztendlich spiegeln die Unterschiede der chromosomalen Binderegionen der PKA ihre unterschiedlichen Funktionen wider. Dies erscheint plausibel, da bereits gezeigt werden konnte, dass die PKA-Isoformen unterschiedliche Funktionen besitzen (Bockmühl *et al.*, 2001).

4.3 Eine Promotorlokalisierung von Tpk2 unter Hypheninduktionsbedingungen korreliert mit dem Transkriptspiegel

Durch ChIP-chip-Analysen unter Hypheninduktionsbedingungen wurde gezeigt, dass die PKA-Isoformen unter diesen Bedingungen verstärkt an nicht-kodierenden Bereichen bzw. Promotorregionen im Genom von *C. albicans* lokalisiert sind (Abb. 3.17). Dies ließ die Vermutung zu, dass die Kinasen unter diesen Wachstumsbedingungen einen Einfluss auf die Transkription dieser Gene haben. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Tpk2 an Promotorregionen die Expression der hyphenspezifischen Gene *HYR1* und *ECE1* sowie *SOK1*, welche für eine Kinase kodiert, beeinflusst. Die Transkriptspiegel dieser Gene waren in Zellen einer *tpk2*-Mutante deutlich erhöht bzw. erniedrigt, was bedeutet, dass die PKA-Isoform eine Rolle in der Regulation der Genexpression spielt. Dabei ist unklar, ob Tpk2 die Gene direkt oder indirekt über z.B. den Transkriptionsfaktor Efg1 reguliert. Lassak *et al.* (2011) führten ChIP-chip-Experimente zum Nachweis von Efg1-Bindestellen unter denselben Bedingungen wie in dieser Arbeit durch und konnten keine Bindung von Efg1 an die Promotorregionen von *HYR1*, *ECE1* und *SOK1* nachweisen. Erst spät nach der Induktion von Hyphen bzw. unter Biofilm-induzierenden Bedingungen bindet der Transkriptionsfaktor in der Nähe dieser Regionen (Lu *et al.*, 2008; Nobile *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Lokalisation von Tpk2 unter Hefewachstumsbedingungen innerhalb des *MSB2*-ORFs keinen Einfluss auf das *MSB2*-Transkript hat (Abb. 3.22). 30 min nach Hypheninduktion ist Tpk2 an dem intergenischen Bereich zwischen *ORF19.1488* und *MSB2* lokalisiert. Während das *MSB2*-Transkript weiterhin unverändert blieb, zeigte sich in einer *tpk2*-Mutante eine Hochregulation des schwachen *ORF19.1488*-Transkriptspiegels.

Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung von Tpk2 kurz nach Induktion der Hyphenbildung an Promotorregionen mit einer Veränderung der Transkriptspiegel der

jeweiligen Gene korreliert, während eine Bindung von Tpk2 innerhalb eines ORFs unter Hefewachstumsbedingungen keinen Einfluss auf die Transkription hat. Tpk2 spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkriptspiegel von Genen, deren Expression kurz nach Hypheninduktion reguliert wird. Die Tatsache, dass viele Zielgene von Tpk2 und Efg1 korrelieren (Tabelle 4.2) spricht dafür, dass diese Gene einer gemeinsamen Regulation von Tpk2 und Efg1 unterliegen. Hinweise darauf konnte auch durch die Vorhersage von Konsensus-Bindesequenzen gewonnen werden (Abb. 3.12 und Abb. 3.19). Für Tpk1 und Tpk2 wurden AG- und AC-reiche Binderegionen identifiziert, wobei für Efg1 ähnliche Sequenzen beobachtet werden konnten (Lassak *et al.*, 2011). In Anbetracht dessen kann man sich ein Modell vorstellen, indem die Aktivierung/Phosphorylierung von Efg1 durch Tpk2 an Promotoren von Genen stattfindet, die von beiden Proteinen reguliert werden. Die Aktivierung kann zügig vollzogen werden, da Tpk2 bereits in „Bereitschaft“ sitzt, was eine ebenfalls zügige Regulation des Zielgens begünstigt.

4.4 Tpk1 ist ein Repressor der *SSD1*-Transkription

Für die PKA-Isoform Tpk1 wurden im Gegensatz zu Tpk2 nur wenige genomische Binderegionen gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass Tpk1 ein Repressor der *SSD1*-Transkription zu sein scheint, da es bei Abwesenheit des Proteins zu einer Hochregulation des *SSD1*-Transkriptes kommt (Abb. 3.20). *SSD1* spielt eine Rolle in der Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden (Gank *et al.*, 2008). Die Rolle der PKA-Isoformen bei der Abwehr dieser Peptide ist noch unbekannt. *C. albicans* ist gegenüber dem antimikrobiellen Peptid Histatin-5 sensitiv (Edgerton *et al.*, 1998). In ersten Versuchen wurde beobachtet, dass die Abwesenheit von Tpk2, aber nicht Tpk1, einen geringen Einfluss bei der Resistenz gegenüber Histatin-5 hat. Bei einem Histatin-5-Assay auf Agarplatten (nach Szafranski-Schneider *et al.*, 2012) zeigte sich in einer *tpk2*-, aber nicht in einer *tpk1*-Mutante, eine leichte Reduktion der Lebensfähigkeit. Während 35 % der WT-Zellen und 30 % der Zellen einer *tpk1*-Mutante eine Behandlung mit 3 µg Histatin-5 überlebten, konnten nur 19 % der *tpk2*-Zellen diese Behandlung überstehen (A. Schäkel, unveröffentlichte Daten).

4.5 Regulation von *EFG1* durch Tpk1 und Tpk2

Efg1 ist in *C. albicans* ein zentraler Transkriptionsfaktor, der durch die PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 aktiviert wird und den Morphogenesewechsel zwischen der Hefe- und Hyphenform steuert. *EFG1* unterliegt einer negativen Autoregulation, da kurz nach der Induktion von Hyphen die Expression des Gens drastisch herunterreguliert wird. Auch wenn der Transkriptionsfaktor anfänglich für die Ausbildung von Hyphen benötigt wird, stört die permanente Anwesenheit des Proteins die Morphogenese (Tebarth *et al.*, 2003). Durch ChIP-chip-Analysen konnten Lassak *et al.* (2011) zeigen, dass Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen an seinem eigenen Promotor lokalisiert ist, wobei zwei Hauptbindesequenzen identifiziert werden konnten. Dabei ist der *EFG1*-Promotor stark aktiv und der *EFG1*-Transkriptspiegel stabil. Wird die Hyphenbildung induziert, reprimiert Efg1 die *EFG1*-Promotoraktivität, was einen schnellen Abfall des *EFG1*-Transkriptspiegels zur Folge hat. Die Reprimierung des *EFG1*-Promotors durch Efg1 ist nur innerhalb eines engen Zeitfensters möglich. Anschließend dissoziiert das Protein von seinem Promotor (Lassak *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität nicht nur von Efg1, sondern auch von der Anwesenheit von Tpk2 abhängt (Lassak *et al.*, 2011).

Die ChIP-chip-Analysen von Tpk1 und Tpk2 zeigten, dass beide PKA-Isoformen an dem Promotor und an der kodierenden Region von *EFG1* binden. Während Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen an seinem eigenen Promotor lokalisiert ist, bindet Tpk2 an den *EFG1*-ORF. 30 min nach Hypheninduktion dissoziiert nicht nur Efg1 von seinem eigenen Promotor, auch Tpk2 ist nicht mehr an der vorherigen Bindestelle zu finden. Unter diesen Bedingungen konnten jedoch für Tpk1 signifikante Bindestellen an der Promotorregion von *EFG1* identifiziert werden. Dabei handelt es sich zudem um eine der Hauptbinderegionen von Tpk1 (Abb. 3.13). Interessanterweise überlappt diese Binderegion mit einer der beiden Hauptzielsequenzen, an welche Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen bindet.

Die Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass Tpk2 an der Herabregulation der *EFG1*-Promotoraktivität beteiligt ist. Das Modell der Regulation von *EFG1* durch die PKA-Isoformen ist in Abb. 4.1 dargestellt. Die Anwesenheit von Tpk2 und Efg1 an dem *EFG1*-Locus könnte zu einer schnellen Herabregulation des *EFG1*-Transkriptes führen. So ist es möglich, dass Tpk2 Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen an seinen eigenen Promotor rekrutiert, was eine konstante Expression von *EFG1* zur Folge hat. Durch die Lokalisation an dem ORF von *EFG1*

sitzt die PKA-Isoform außerdem in „Bereitschaft“ um eine schnelle Aktivierung von Efg1 am Anfang der Hypheninduktion zu gewährleisten.

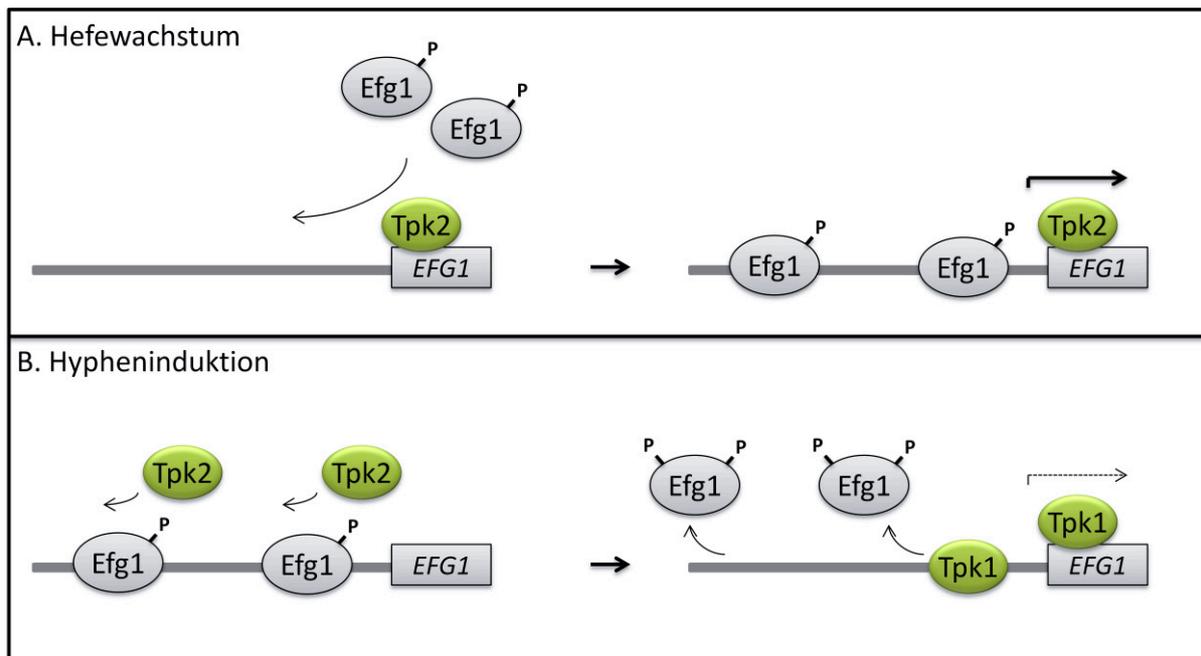


Abb. 4.1: Modell zur Regulation von *EFG1* durch Tpk1 und Tpk2. Modifiziertes Modell nach Lassak *et al.*, 2011. (A) Unter Hefewachstumsbedingungen bindet Tpk2 an dem ORF von *EFG1*. Die Kinase rekrutiert den Transkriptionsfaktor Efg1 an seine zwei Hauptbinderegionen. (B) Während der Hypheninduktion wird Efg1 zügig von Tpk2 phosphoryliert, was in einer Dissoziation von Efg1 resultiert. Dies führt zu einer drastischen Senkung der *EFG1*-Promotoraktivität, welche möglicherweise zusätzlich auf die zügige Bindung von Tpk1 zurückzuführen ist. Die Kinase bindet an eine der Hauptzielsequenzen, an die Efg1 unter Hefewachstumsbedingungen bindet und innerhalb des *EFG1*-ORFs.

Eine Aktivierung von Efg1 durch Tpk2 in Form einer Phosphorylierung ist denkbar, konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Lassak *et al.* (2011) konnten zeigen, dass Efg1 bereits unter Hefewachstumsbedingungen stark phosphoryliert ist. Dennoch wird angenommen, dass es nach Induktion der Hyphenbildung zu einer zusätzlichen Phosphorylierung kommt, welche aber durch eine SDS-PAGE bisher nicht nachweisbar war (Lassak *et al.*, 2011). Letztendlich könnte die Aktivierung von Efg1 durch Tpk2 dazu führen, dass Efg1 den *EFG1*-Promotor reprimiert und beide Proteine vom *EFG1*-Locus dissoziieren. Währenddessen bindet Tpk1 innerhalb des *EFG1*-Promotors an eine der Hauptbindesequenzen von Efg1 sowie an dessen ORF. Dies könnte eine erneute Bindung von Efg1 und somit eine Hochregulation des *EFG1*-Promotors verhindern. Insgesamt scheinen beide PKA-Isoformen eine Rolle in der Regulation von *EFG1* zu spielen, wobei sich die Regulationsmuster stark unterscheiden.

4.6 Sch9 ist ein Zentromer-assoziiertes Protein in *C. albicans*

Die genomische Lokalisation der AGC-Kinase Sch9 zeigte eine Bindung des Proteins an alle acht Zentromere (*CEN*) von *C. albicans* (siehe Anhang, Abb. 9.2). Dies wurde unter normoxischen sowie hypoxischen Bedingungen beobachtet. Vergleichende ChIP-chip-Analysen von Sch9 in *S. cerevisiae* zeigten keine *CEN*-Assoziation des Proteins. Es muss jedoch beachtet werden, dass die *CENs* verschiedener Organismen sehr stark variieren. Holozentrische *CENs* können über das ganze Chromosom verteilt sein, wohingegen sich monozentrische *CENs* auf eine Region auf dem Chromosom beschränken. Bei den meisten Organismen findet man die drei Typen der monozentrischen *CENs*: Punktzentromere sowie kleine und große regionale *CENs* (Sanyal, 2012). *S. cerevisiae* besitzt kleine (ca. 125 bp) Punktzentromere, welche nur über ihre DNA-Sequenz definiert sind und daher konservierte Protein-Bindemotive besitzen. Höhere Eukaryoten besitzen kleine oder große regionale *CENs* ohne konservierte Bindemotive, die wesentlich größer als Punktzentromere sind (bis 4000 kb) und aus AT-reichen, repetitiven DNA-Sequenzen bestehen (Sanyal, 2012; Cleveland *et al.*, 2003; Sanyal *et al.*, 2004). Die kleinen, regionalen *CENs* von *C. albicans* umfassen 4,2 bis 18,2 kb und besitzen keine ORFs (Sanyal *et al.*, 2004). Die unterschiedlichen Bindungsverhalten von Sch9 in *C. albicans* und *S. cerevisiae* lassen sich daher möglicherweise durch ihre unterschiedlichen *CENs* erklären. Durch Verwendung des Programms „RSAT dyad-analysis (spaced pairs)“ (van Helden *et al.*, 2000) wurde innerhalb der Sch9-Bindestellen nach einem Bindemotiv für Sch9 aus *C. albicans* gesucht; es konnte jedoch keine Konsensussequenz gefunden werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang damit, dass regionale *CENs* kein bestimmtes Protein-Bindemotiv besitzen.

Die Funktion der *CENs* ist es, eine Plattform für die Entstehung des Kinetochors zu bilden. Der Kinetochor ist ein Proteinkomplex der als Anhaltspunkt für die Anheftung der Mikrotubuli des Spindelapparates dient und daher essentiell für die Chromosomensegregation in der Mitose und Meiose ist (Sanyal und Carbon, 2002). Auch in den Spindelkontrollpunkt-Mechanismus ist der Kinetochor involviert. Hierbei wird dafür gesorgt, dass die Chromatiden erst bei korrekter Interaktion des Kinetochors mit den Mikrotubuli voneinander getrennt werden (Roy *et al.*, 2013). Das hochkonservierte Kinetochor-Protein CENP-A (centromeric protein-A), eine Variante von Histon-H3, ist an den *CEN*-Regionen aller Organismen zu finden und scheint diese zu definieren. Die *CENs* von *C.*

albicans sind bereits als Bindestellen von Cse4, einem zu CENP-A homologen Protein, identifiziert worden (Sanyal und Carbon, 2002).

In Kooperation mit Tanmoy Chakraborty und Prof. Kaustuv Sanyal (Molecular Biology & Genetics Unit; Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research Jakkur, Bangalore; Indien) wurde daher der Einfluss von Sch9 auf die Chromosomensegregation untersucht. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in einer *sch9*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu einem stark erhöhten (etwa 250-fachen) Chromosomenverlust kommt (unveröffentlichte Daten). Vermutlich ist Sch9 Teil des Kinetochor-Komplexes oder spielt eine Rolle in dessen Integrität. Denkbar wäre auch, dass das Protein die Chromosomensegregation am Spindel-Kontrollpunkt kontrolliert. Eine essentielle Rolle von Sch9 als Teil des Kinetochor-Komplexes kann jedoch ausgeschlossen werden, da in einer *sch9*-Mutante keine Abweichung der Lokalisation von Cse4 (GFP-markiert) beobachtet werden konnte. Die Rolle der Sch9-Bindung an die *CENs* in *C. albicans* ist noch nicht geklärt, jedoch deuten die Ergebnisse auf die Wachstums-stimulierenden Funktionen von Sch9 hin.

4.7 Der Einfluss von Sch9 auf das Zellwachstum

Eine in *C. albicans* und *S. cerevisiae* konservierte Sch9-Bindestelle ist der rDNA-Multilocus (*RDN1*) (Abb. 3.25). In *C. albicans* war dieser Bereich neben den *CEN*-Regionen eine Hauptbinderegion von Sch9 (Abb. 3.23). Diese Lokalisation passt zu bekannten Funktionen des Proteins in *S. cerevisiae*. Als Teil des TOR-Signalweges reguliert Sch9 die Zellgröße in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot (Urban *et al.*, 2007; Jorgensen *et al.*, 2002; Cardenas *et al.*, 1999). Daher führt eine Deletion von *SCH9* zu einer Verminderung der Koloniegröße (Jorgensen *et al.*, 2002). Diesen Effekt konnte Stichternoth (2009) ebenfalls in einer *sch9*-Mutante in *C. albicans* beobachten. Das Wachstum von Zellen ist abhängig von der Ribosomensynthese und der Einfluss von Sch9 auf die Expression der Gene der ribosomalen Proteine und auf die Ribosomenbiogenese wurde bereits gezeigt (Jorgensen *et al.*, 2004). In *C. albicans* wurde beobachtet, dass *sch9*-Mutanten sensitiv gegenüber Hygromycin B sind (Setiadi, 2006). Diese Substanz induziert Fehllösungen an Ribosomen, weshalb vermutet wird, dass Sch9 in beiden Organismen an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist (Setiadi, 2006). Durch die Tatsache, dass Sch9 an die rDNA in *S. cerevisiae* sowie in *C. albicans* bindet wird diese These erneut bekräftigt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems außerdem Mpp10 als möglicher Interaktionspartner von Sch9 identifiziert. Für dieses Protein ist aus *S. cerevisiae* bekannt, dass es eine Komponente des U3 snoRNP („small nucleolar ribonucleoprotein“)-Komplexes ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Proteinkomplex an der rRNA-Prozessierung beteiligt ist und besonders die Prozessierung des rRNA-Vorläufers der 18S-rRNA beeinflusst (Dunbar *et al.*, 1997). Es wäre vorstellbar, dass Sch9 das Zellwachstum durch eine Interaktion mit Mpp10 und somit durch die Beschleunigung der Ribosomenbiogenese beeinflusst.

Als ein weiterer potentieller Interaktionspartner von Sch9 konnte außerdem Hir3 gefunden werden. Dabei handelt es sich um ein Homolog von Hir3 aus *S. cerevisiae*, welches Teil des HIR (histon regulation)-Komplexes ist. Dieser Komplex bindet an die DNA, fördert die Anlagerung von Histonen und reguliert somit die Nukleosomen-Assemblierung (Prochasson *et al.*, 2005). Es wäre denkbar, dass Sch9 als Regulator des HIR-Komplexes fungiert und somit eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression trägt. In *S. cerevisiae* wurde weiterhin das RxxS-Motiv als Phosphorylierungsstelle für Sch9 identifiziert (Pultz *et al.*, 2012). Hir3 besteht aus 1591 Aminosäuren (AS) und interessanterweise kommt das RxxS-Motiv siebenmal in der Proteinsequenz von Hir3 vor. Im Vergleich dazu ist in der Proteinsequenz von Mpp10 (567 AS) dieses Motiv nur einmal aufzufinden. Dies ist nicht nur ein Hinweis darauf, dass Hir3 ein Interaktionspartner von Sch9 sein könnte, sondern lässt auch vermuten, dass es sich bei dem RxxS-Motiv auch um ein Phosphorylierungsmotiv von Sch9 aus *C. albicans* handelt.

4.8 Die Regulation der Hyphenbildung unter Hypoxie, erhöhten CO₂-Konzentrationen und Temperaturen < 37 °C

Als humanpathogener Organismus muss sich *C. albicans* an verschiedene O₂- und CO₂-Konzentrationen anpassen. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen und Signalwege ist dabei von großer Bedeutung. Vorangehende Studien zur Untersuchung der Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen haben eine duale Funktion des Transkriptionsfaktors Efg1 festgestellt. Während er unter normoxischen Bedingungen einen Aktivator der Hyphenbildung darstellt, reprimiert er diese unter Hypoxie und Temperaturen < 37 °C. Deswegen wurde angenommen, dass unter diesen Bedingungen ein alternativer Signalweg für die Ausbildung der Hyphen verantwortlich sein muss (Setiadi *et al.*, 2006). Die

AGC-Kinase Sch9 wurde bereits als Teil dieses Signalweges identifiziert, wobei gezeigt wurde, dass die Repressorwirkung des Proteins CO₂-abhängig ist (Setiadi, 2006).

Die Untersuchung dieses alternativen Signalweges war Bestandteil dieser Arbeit. So wurde untersucht, ob die TOR-Sch9-Rim15-Kaskade aus *S. cerevisiae* ebenfalls in *C. albicans* existiert und unter Hypoxie, hohen CO₂-Konzentrationen und niedrigen Temperaturen die Hyphenbildung steuert. Außerdem wurde nach möglichen Komponenten gesucht, die unter diesen Bedingungen an der Regulation der Hyphenbildung beteiligt sind.

4.8.1 Einfluss der Komponenten des HOG-Signalweges

Erst kürzlich beschrieben Su *et al.* (2013) eine Verbindung zwischen dem TOR- und dem HOG-Signalweg (Abb. 3.32). Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag dabei auf der Brg1-abhängigen Hyphenregulation. Um die Hyphenbildung aufrecht zu erhalten, rekrutiert der Transkriptionsfaktor Brg1 die Histon-Deacetylase Hda1 an hyphenspezifische Gene (Lu *et al.*, 2012). Su *et al.* (2013) gehen davon aus, dass die Hog1-Kinase die Expression von *BRG1* durch die Aktivierung des transkriptionellen Repressors Sko1 hemmt. Das Modell der Arbeitsgruppe geht dabei von verschiedenen Phosphorylierungsstufen von Hog1 aus (Abb. 3.32). Hog1 besitzt dabei eine basale Phosphorylierung, die dazu führt, dass Sko1 aktiviert wird und die Expression von *BRG1* hemmt, was letztendlich die Hyphenbildung verhindert. Bei oxidativem Stress kommt es zu einer zusätzlichen Phosphorylierung von Hog1 durch die Kinase Pbs2, was zur Aktivierung der Stressantwort führt. Bei Nährstofflimitierung hingegen wird die Tor1-Kinase gehemmt, was zur Aktivierung der Phosphatasen Ptp2 und Ptp3 führt. Diese dephosphorylieren Hog1, wodurch die Hyphenbildung ermöglicht wird, da Sko1 nicht aktiviert werden kann und es somit nicht zu einer Hemmung der *BRG1*-Expression kommt.

Der Einfluss der Komponenten des HOG-Signalweges auf die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen wurde in Abschnitt 3.4.6 untersucht. Die Kinasen Pbs2 und Hog1 scheinen reprimierende Rollen auf die Hyphenbildung zu haben, da ihre Mutanten einen filamentösen Phänotypen aufweisen. Bei Ptp2 und Ptp3 hingegen kommt es nur bei Verlust von beiden Phosphatasen zu einem filamentösen Phänotypen, weshalb die Proteine wahrscheinlich nur gemeinsam eine hemmende Wirkung auf die Hyphenbildung besitzen. Eine Hemmung von Tor1 führte in einer *brg1*-Mutante zu einer Abwesenheit von Hyphen, was dafür spricht, dass der Transkriptionsfaktor ein Aktivator der Filamentbildung ist. Die Aktivierung führt aber nicht über Hda1, da eine *hda1*-Mutante bei Tor1-Hemmung weiterhin

Hyphen zeigt. In einer *sch9*-Mutante stieg der relative Transkriptspiegel von *BRG1* an (Abb. 3.34), was vermuten lässt, dass die Hemmung der Hyphenbildung durch Sch9 über Brg1 stattfinden könnte. Eine Überexpression von *HOG1* konnte den *sch9*-Phänotypen nicht komplementieren und Sch9 scheint auch nicht den Transkriptspiegel der Kinase zu beeinflussen (Abb. 3.34 und 3.35). Allerdings vermuteten Su *et al.*, (2013), dass der TOR-Signalweg lediglich den Phosphorylierungsgrad der Hog1-Kinase beeinflusst. Auch wenn einige Ergebnisse Hinweise auf den Zusammenhang der Signalwege geben, ist die Bedeutung des HOG-Signalweges unter Hypoxie und dessen Einfluss auf die Filamentbildung noch unklar.

4.8.2 Der Tor1-Sch9-Signalweg reguliert zusammen mit dem PKA-Signalweg die Hyphenbildung

In *S. cerevisiae* reguliert die TOR-Sch9-Rim15-Kaskade verschiedene Funktionen, wobei die AGC-Kinasen Sch9 und Rim15 antagonistische Rollen inne haben. Rim15 aktiviert Gene der Stressantwort und wird von Sch9 direkt durch Phosphorylierung gehemmt (Cameroni *et al.*, 2004; Wanke *et al.*, 2008). Die Konstruktion einer *sch9 rim15* - Doppelmutante in Abschnitt 3.4.1 sollte daher Aufschluss darüber geben, ob in *C. albicans* Rim15 unterhalb von Sch9 agiert. Es wurde vermutet, dass der hyperfilamentöse *sch9*-Phänotyp durch eine fehlende Reprimierung von Rim15 zu Stande kommt. Da die konstruierte Doppelmutante aber weiterhin in der Lage war Hyphen auszubilden, ist der *sch9*-Phänotyp unabhängig von Rim15.

Rapamycin und Koffein sind Inhibitoren der TOR-Kinase (Wanke *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Tor1-Sch9-Kaskade in *C. albicans* existiert, da der Wildtypstamm in Anwesenheit der Inhibitoren denselben Phänotypen wie die *sch9*-Mutante aufweist. Unter hypoxischen Bedingungen, hohen CO₂-Konzentrationen und Temperaturen < 37 °C reprimiert die Tor1-Sch9-Kaskade die Hyphenbildung. Um herauszufinden, welche Komponenten für die Hyphenbildung verantwortlich sind, wenn der Tor1-Sch9-Signalweg inhibiert wird, wurden verschiedene Mutantenstämme in der Anwesenheit von Koffein getestet (Abb. 3.30). Es wurde beobachtet, dass die Komponenten des PKA-Signalweges Ras1, Cyr1, Tpk2 und teilweise Tpk1 benötigt werden, um eine Hyperfilamentierung in Anwesenheit von Koffein auszulösen. Dieses Ergebnis wird durch den Befund aus Abschnitt 3.4.5 unterstützt, der zeigt, dass das „Quorum Sensing“-Molekül Farnesol (ein Inhibitor des

PKA-Signalweges; Davis-Hanna *et al.*, 2008), die Hyphenbildung der *sch9*-Mutante hemmt. Somit reguliert der PKA-Signalweg die Hyphenbildung, wenn der Tor1-Sch9-Signalweg blockiert wird. Weitere Komponenten, die bei der Inhibierung von Tor1 an der Hyphenbildung beteiligt sein könnten, sind die Transkriptionsfaktoren Czf1, Ace2, Nrg1 und Flo8. In Abb. 4.2 wird die Regulation der Hyphenbildung durch Sch9 unter hypoxischen Bedingungen, hohen CO₂-Konzentrationen und Temperaturen unter 37 °C in einem Modell zusammengefasst.

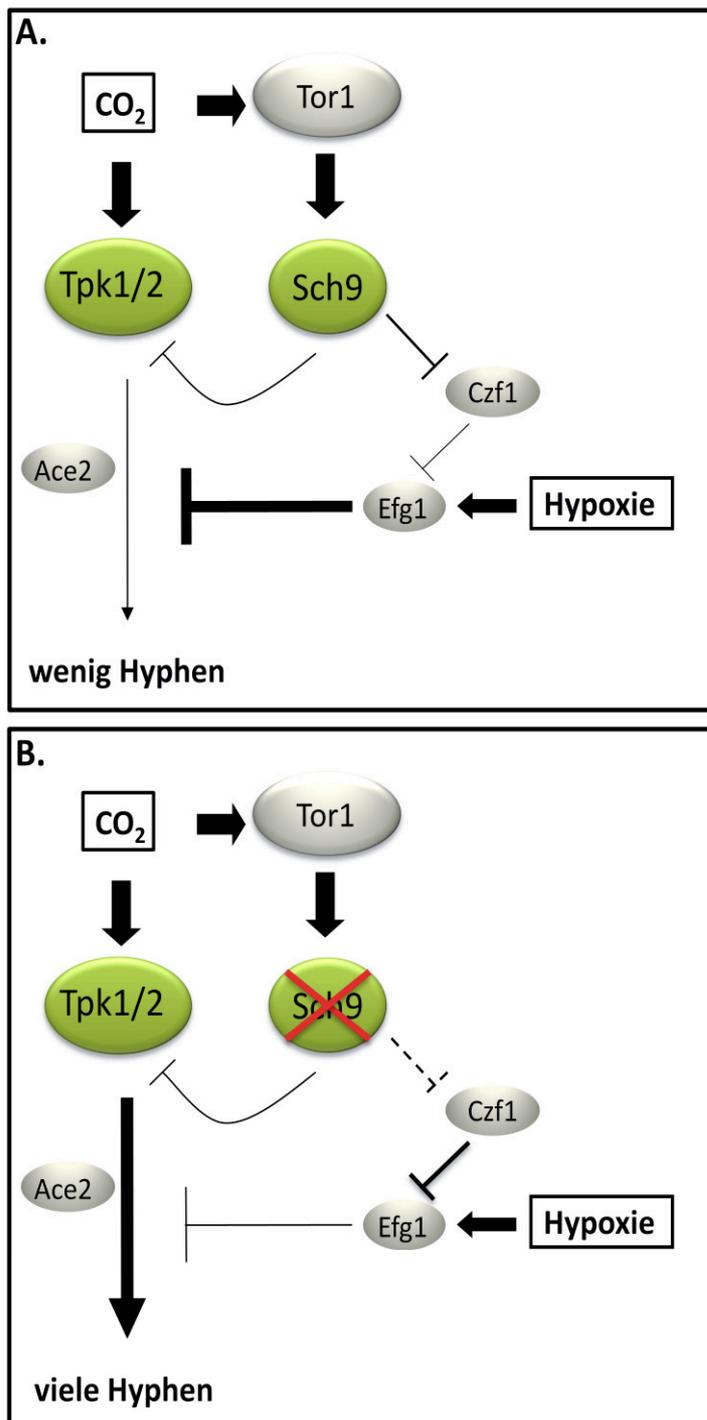


Abb. 4.2: Modell der Regulation der Hyphenbildung durch Sch9.

(A) Regulation der Hyphenbildung unter Hypoxie, hohen CO₂-Konzentrationen und 25 °C im Wildtypstamm. Unter hypoxischen Bedingungen ist Efg1 ein Repressor der Hyphenbildung und wird durch seinen Gegenspieler Czf1 limitiert. Bei hohen CO₂-Konzentrationen sind die PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 für die Filamentierung verantwortlich. Dabei spielt der Transkriptionsfaktor Ace2 eine wichtige Rolle, da er für die Hyphenbildung unter Hypoxie benötigt wird (Mulhern *et al.*, 2006). Der parallel verlaufende Tor1-Sch9-Signalweg hemmt die Ausbildung von Hyphen. Dies könnte direkt durch Hemmung der PKA geschehen oder indirekt über den inhibierenden Einfluss auf Czf1 und die daraus resultierende Hemmung der Efg1-Repressoraktivität. (B) Die Abwesenheit von Sch9 führt zu einer verminderten Repressoraktivität von Efg1, was zur Hyperfilamentation führt.

Unter der Annahme, dass der Tor1-Sch9-Weg parallel zum PKA-Signalweg verläuft, wäre eine Regulation von Czf1 durch Sch9 denkbar. Eine reprimierende Wirkung von Czf1 auf Efg1 konnte bereits unter normoxischen Bedingungen gezeigt werden (Brown *et al.*, 1999; Giusani *et al.*, 2002), weshalb es zu dieser Regulation auch unter hypoxischen Bedingungen kommen könnte. Da Efg1 unter Hypoxie die Filamentierung hemmt, der PKA-Signalweg jedoch nach wie vor die Hyphenbildung kontrolliert, scheint diese durch andere Transkriptionsfaktoren stimuliert zu werden. Ace2 reguliert Gene der Zellteilung und gilt als möglicher Aktivator in diesem Modell, da bereits gezeigt wurde, dass das Protein auch für die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingung benötigt wird (Kelly *et al.*, 2004; Mulhern *et al.*, 2006). Es ist noch unklar, in welchem Verhältnis die Transkriptionsfaktoren Flo8 und Nrg1 zu diesem Modell stehen. Für Flo8 wird angenommen, dass das Protein zusammen mit Efg1 die Hyphenbildung unter Normoxie steuert (Cao *et al.*, 2006). Eine Rolle von Flo8 in dem Signalweg unter Hypoxie wäre denkbar, da eine direkte Interaktion der Proteine bereits nachgewiesen werden konnte (Noffz *et al.*, 2008). Erst kürzlich beschrieben Du *et al.* (2012) die Rolle dieses Transkriptionsfaktors als Schlüsselregulator der CO₂-vermittelten Hyphenbildung. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass Flo8 bei Tor1-Inhibierung für die CO₂-abhängige Filamentierung sogar benötigt wird (Abb. 3.30). Nrg1 ist unter Normoxie ein Repressor der Hyphenbildung (Murad *et al.*, 2001a). Interessanterweise ist das Protein jedoch bei Anwesenheit von Koffein für die Hyperfilamentierung sogar notwendig (Abb. 3.30). Somit könnte dieser Transkriptionsfaktor wie Efg1 unter hypoxischen Bedingungen eine alternative Funktion bei der Hyphenbildung einnehmen.

4.8.3 Eine Überexpression von *RAS1* oder *TPK2* supprimiert den *sch9*-Phänotypen

Unter normoxischen Bedingungen zeigen *ras1*- und *tpk2*-Mutanten einen Defekt in der Hyphenbildung. Eine Überexpression der entsprechenden Gene induziert die Filamentierung (Feng *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass der *sch9*-Phänotyp durch Überexpression von *RAS1* und *TPK2* supprimiert werden kann (Abb. 3.35). Es wäre denkbar, dass Tpk2 von Sch9 reguliert wird, da bereits in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, dass Sch9 die PKA-Aktivität über die Regulation von Bcy1 steuert (Zhang *et al.*, 2012). Diese Beobachtung steht dennoch im genauen Gegensatz zu vorangehenden Ergebnissen und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Eine Erklärung für die widersprüchlichen Daten wäre, dass für die Regulation der Hyphenbildung ein intermediäres Ras1- bzw. Tpk2-

Proteinlevel benötigt wird. Möglicherweise spielt die Homöostase der Komponenten der Signalwege eine wichtige Rolle und die beiden Proteine stellen dabei wichtige Schaltstellen der Hyphenregulation dar. Es ist bekannt, dass Tpk1 und Tpk2 unterschiedliche Funktionen haben (Bockmühl *et al.*, 2001), was u.a. auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Das unerwartete Ergebnis der *TPK2*-Überexpression könnte dadurch erklärt werden, dass das Gleichgewicht der PKA-Isoformen und somit ihre Funktionen verändert worden sind. So ist es denkbar, dass Tpk2, aber nicht Tpk1, unter Hypoxie nach wie vor Efg1 reguliert und dies erst durch die hohe Proteinkonzentration zur Geltung kommt. Weiterhin könnte es durch die Überproduktion von Ras1 und/oder Tpk2 zur Rekrutierung anderer Transkriptionsfaktoren kommen, die die Hyphenbildung blockieren.

5 Zusammenfassung

AGC-Kinasen sind konservierte Serin-/Threoninkinasen, die im humanpathogenen Pilz *Candida albicans* das Zellwachstum und die Morphogenese regulieren. Die Proteinkinase A (PKA) aktiviert den zentralen Transkriptionsfaktor Efg1, der die Morphogenese zwischen einer Hefe- und einer Hyphenwuchsform reguliert. Durch diesen Dimorphismus ist *C. albicans* in der Lage, normoxische Bereiche (z.B. die Haut) oder hypoxische Regionen (innere Organe) des Körpers zu besiedeln. Die Proteinkinase B Sch9 reprimiert die Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen und fördert dadurch die Proliferation der Hefeform von *C. albicans*.

Durch die Kombination von Chromatinimmunpräzipitation und Microarray-Hybridisierung (ChIP-chip) wurden genomweite Bindesequenzen der PKA-Isoformen Tpk1 und Tpk2 unter Hefewachstums- und Hypheninduktionsbedingungen identifiziert. Während des Hefewachstums lokalisierten beide Isoformen hauptsächlich innerhalb von kodierenden Genregionen (ORFs). Die Bildung des PKA-Holoenzym war hierfür nicht erforderlich, da die regulatorische Untereinheit Bcy1 andere chromosomale Binderegionen aufwies. Kurz nach der Induktion von Hyphen veränderten sich die genomischen Bindestellen von Tpk1 und Tpk2 und die Isoformen lokalisierten präferenziell an Promotorregionen. Insbesondere Tpk2-Bindestellen markierten dabei wichtige Regulatorgene der Morphogenese. Vergleiche von *tpk*-Mutanten mit Wildtypzellen zeigten, dass die Promotorbindung von Tpk2 mit dem Transkriptspiegel der Zielgene korreliert.

Unter Beteiligung der PKA-Isoform Tpk2 wird das *EFG1*-Gen bei der Hypheninduktion negativ autoreguliert (Lassak *et al.*, 2011). ChIP-chip-Versuche zeigten, dass Tpk2 bei Hefewachstum an den *EFG1*-ORF bindet, während bei Hypheninduktion Tpk1 mit Efg1-Binderegionen im *EFG1*-Promotor ko-lokalisiert. Die Korrelation von Tpk2- mit Efg1-Bindestellen lässt eine gemeinsame Regulation der Zielgene vermuten. Möglicherweise beschleunigt die ORF-Lokalisation der PKA-Isoformen die zügige Phosphorylierung von Efg1 und erleichtert dadurch die Hyphenmorphogenese.

Die AGC-Kinase Sch9 hat unter bestimmten hypoxischen Bedingungen ($O_2 < 10\%$, $CO_2 > 1\%$, Temperaturen $< 37\text{ °C}$) die Funktion, die Hyphenbildung zu reprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der vorgeschalteten Tor1-Kinase, aber nicht der nachgeschalteten AGC-Kinase Rim15, für diese Suppression benötigt wird. Auf der Suche nach Zielgenen der Hyphenrepression wurden genomische ChIP-chip-Analysen durchgeführt, die jedoch fast ausschließlich eine Assoziation mit allen acht Zentromerregionen zeigten. Zusätzlich war Sch9 am *RDN1*-Locus lokalisiert, der für ribosomale RNA kodiert. Beide Bindeorte wurden bei normoxischem, wie bei hypoxischem Wachstum nachgewiesen. Die Wachstums-stimulierenden Funktionen von Sch9 könnten daher teilweise durch die Förderung der Chromosomensegregation zustande kommen. Die Bindung von Sch9 an den *RDN1*-Locus, aber nicht an Zentromerregionen, wurde in parallelen ChIP-chip-Analysen auch in *S. cerevisiae* nachgewiesen. Diese Bindestelle ist daher wahrscheinlich in Pilzen konserviert und könnte die Ribosomenbiogenese stimulieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Analyse ihrer genomischen Bindestellen bekannte und neue Zielgene der Signalwege von AGC-Kinasen identifiziert wurden. Die Abhängigkeit der Binderegionen von den Wachstumsbedingungen verdeutlicht dabei die regulatorischen Rollen der AGC-Kinasen bei der Hyphenmorphogenese.

6 Summary

AGC kinases are conserved serine/threonine kinases that regulate growth and morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. The protein kinase A (PKA) activates the central transcription factor Efg1, which regulates the morphogenesis between a yeast and a hyphal growth form. This dimorphism enables *C. albicans* to colonize normoxic areas (e. g. skin), as well as hypoxic regions (inner organs) of the body. The protein kinase B Sch9 represses hyphal formation during hypoxic conditions and thus promotes the proliferation of the yeast form of *C. albicans*.

By the combination of chromatin immunoprecipitation and microarray-hybridisation (ChIP chip) genome-wide binding sequences of the PKA isoforms Tpk1 and Tpk2 were identified under yeast growth and hyphal induction conditions. During yeast growth both isoforms were located primarily within coding regions (ORFs). The formation of a PKA holoenzyme was not necessary, since the regulatory subunit Bcy1 showed different chromosomal binding regions. Shortly after hyphal induction the genomic binding sites of Tpk1 and Tpk2 changed and the isoforms were preferentially located at promoter regions. In particular, Tpk2 binding sites were found next to genes encoding regulators of morphogenesis. Comparisons of *tpk*-mutants and wild-type cells showed that binding of Tpk2 within promoter regions correlates with the transcript level of the corresponding gene.

In conjunction with the PKA-isoform Tpk2, *EFG1* is negatively autoregulated during hyphal induction (Lassak *et al.*, 2011). ChIP chip experiments showed that during yeast growth Tpk2 binds to the *EFG1*-ORF, while after hyphal induction Tpk1 is co-localized at *EFG1*-binding sites at the *EFG1*-Promotor. The correlation between Tpk2 and Efg1 binding sites indicates a joint regulation of their target genes. It is possible that the ORF localization of the Tpk-Isoforms accelerates the phosphorylation of Efg1, which in turn facilitates hyphal morphogenesis.

The AGC kinase Sch9 has the function of preventing hyphal formation under special hypoxic conditions ($O_2 < 10\%$, $CO_2 > 1\%$, temperatures $< 37\text{ }^\circ\text{C}$). It has been shown that the activity of the upstream Tor1 kinase, but not the downstream AGC kinase Rim15 is needed for this suppression. In search of new target genes of hyphal repression, genomic ChIP chip analyses were performed, which almost exclusively showed an association with all eight centromeric regions. Additionally, Sch9 was localized at the *RDN1* locus, which encodes for ribosomal RNA. Both binding regions were identified under normoxic and hypoxic growth conditions. The growth stimulating effects of Sch9 can therefore be partially explained by the support of chromosome segregation. Binding of Sch9 to the *RDN1* locus, but not to centromeric regions, was also identified in parallel ChIP chip analyses in *S. cerevisiae*. This binding site appears to be conserved among fungi and could probably stimulate ribosomal biogenesis.

In summary, the analyses of their genomic binding sites identified known and new target genes of the signalling pathways of AGC kinases. The dependence of the binding sites on growth conditions illustrates the regulatory roles of AGC kinases during hyphal morphogenesis.

7 Literaturverzeichnis

- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sánchez, M., and Nombela, C. (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 3058-3068.
- Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D.M., Prieto, D., Urrialde, V., Nombela, C., and Pla, J. (2010) The Sko1 protein represses the yeast-to-hypha transition and regulates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 587-601.
- Arana, D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., and Pla, J. (2005) The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology* **151**: 1033-1049.
- Arnaud, M.B., Costanzo, M.C., Skrzypek, M.S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S.R., and Sherlock, G. (2005) The *Candida* Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information. *Nucleic Acids Res* **33**: D358-363.
- Beene, D.L., and Scott, J.D. (2007) A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 192-198.
- Belham, C., Wu, S., and Avruh, J. (1999) PDK1 - a kinase at the hub of things. *Curr Biol* **9**: R93-R96.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR* **7**: 1513-1523.
- Blankenship, J.R., Fanning, S., Hamaker, J.J., and Mitchell, A.P. (2010) An extensive circuitry for cell wall regulation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**: e1000752
- Bockmühl, D.P., and Ernst, J.F. (2001) A potential phosphorylation site for an A-kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* **157**: 1523-1530.
- Bockmühl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A., and Ernst, J.F. (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**: 1243-1257.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brand, A., MacCallum, D.M., Brown, A.J., Gow, N.A. and Odds, F.C. (2004) Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryot Cell* **3**: 900-909.
- Braun, B.R., and Johnson, A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**: 105-109.
- Braun, B.R., Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J* **20**: 4753-4761.

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

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

Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C. (2004) The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle* **3**: 462-468.

Cannon, R.D., Jenkinson, H.F., and Shepherd, M.G. (1992) Cloning and expression of *Candida albicans* *ADE2* and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **235**: 453-457.

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

Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J., and Heitman, J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* **13**: 3271-3279.

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

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

Chauvel, M., Neseir, A., Cabral, V., Znaidi, S., Goyard, S., Bachellier-Bassi, S., Firon, A., Legrand, I., Diogo, D., Naulleau, C., Rossignol, T., and d'Enfert, C. (2012) A versatile overexpression strategy in the pathogenic yeast *Candida albicans*: identification of regulators of morphogenesis and fitness. *PLoS ONE* **7**: e45912.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003) Centromeres and kinetochores - from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**: 407-421.

Cruz, M.C., Goldstein, A.L., Blankenship, J., Del Poeta, M., Perfect, J.R., McCusker, J.H., Bennani, Y.L., Cardenas, M.E., and Heitman, J. (2001) Rapamycin and less immunosuppressive analogs are toxic to *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* via FKBP12-dependent inhibition of TOR. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3162-3170.

Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Imm* **66**: 2713-2721.

- Davis-Hanna, A., Piispanen, A.E., Stateva, L.I., and Hogan, D.A. (2008) Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol Microbiol* **67**: 47-62.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006) The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 1476-1481.
- Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S.M., Roberts, B., and Richardson, W.D. (1988). The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J Cell Biol* **107**: 841-849.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J., and Ernst, J.F. (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 3167-3180.
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A., and Tanaka, K. (1992) Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J Gen Microbiol* **138**: 2243-2251.
- Douglas, L. J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30-36.
- Du, H., Guan, G., Xie, J., Cottier, F., Sun, Y., Jia, W., Mühlischlegel, F.A., and Huang, G. (2012) The transcription factor Flo8 mediates CO₂ sensing in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **23**: 2692-2701.
- Dumitru, R., Navarathna, D.H., Semighini, C.P., Elowsky, C.G., Dumitru, R.V., Dignard, D., Whiteway, M., Atkin, A.L., and Nickerson, K.W. (2007) *In vivo* and *in vitro* anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**: 465-472.
- Dunbar, D.A., Wormsley, S., Agentis, T.M., and Baserga, S.J. (1997). Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast. *Mol Cell Biol* **17**: 5803-5812.
- Edgerton, M., Koshlukova, S.E., Lo, T.E., Chrzan, B.G., Straubinger, R.M., and Raj, P.A. (1998) Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 20438-20447.
- Elson, S.L., Noble, S.M., Solis, N.V., Filler, S.G., and Johnson, A.D. (2009) An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth. *PLoS Genet* **5**: e1000664.
- Enyenihi, A.H. and Saunders, W.S. (2003) Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 47-54.
- Ernst, J.F., and Tielker, D. (2009) Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell Microbiol* **11**: 183-190.
- Ernst, J.F. (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1763-1774.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pietcher S.D., Gendron, C.M., and Longo, V.D. (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**: 288-290.

- Feng, Q., Summers, E., Guo, B., and Fink, G. (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 6339-6346.
- Finkel, J.S., Xu, W., Huang, D., Hill, E.M., Desai, J.V., Woolford, C.A., Nett, J.E., Taff, H., Norice, C.T., Andes, D.R., Lanni, F., and Mitchell, A.P. (2012) Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. *PLoS Pathog* **8**: e1002525.
- Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Gancedo, J.M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* **206**: 297-313.
- Gank, K.D., Yeaman, M.R., Kojima, S., Yount, N.Y., Park, H., Edwards, J.E., Jr, Filler, S.G., and Fu, Y. (2008) *SSD1* is integral to host defense peptide resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **7**: 1318-1327.
- Ghannoum, M.A., Jurevic, R.J., Mukherjee, P.K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., and Gillevet, P.M. (2010) Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* **6**: e1000713
- Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R.M., and Passeron, S. (2009) Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage. *Yeast* **26**: 273-285.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (1995) Transforming yeast with DNA. *Meth Mol Cell Biol* **5**: 255-269.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**: 1077-1090.
- Giusani, A.D., Vinces, M., and Kumamoto, C.A. (2002) Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* **160**: 1749- 1753.
- Grahl, N., and Cramer, R.A. (2010) Regulation of hypoxia adaptation: an overlooked virulence attribute of pathogenic fungi? *Med Mycol* **48**: 1-15.
- Greenspan, D., and Greenspan, J.S. (1996) HIV-related oral disease. *Lancet* **348**: 729-733.
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M.D., and Ruis, H. (2000) Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1449-1456.
- Guyton, A.C., and Hall, J.E. (2000) Textbook of Medical Physiology. Saunders, W.B.: Philadelphia, PA.
- Hall, R.A., Sordi, L.D., MacCallum, D.M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J.W., Robinson, G.K., Levin, L.R., Buck, J., Wang, Y., Gow, N.A.R., Steegborn, C., and Mühlischlegel, F.A. (2010) CO₂ acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**: e1001193.

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**: 576-596.
- Hnisz, D., Bardet, A.F., Nobile, C.J., Petryshyn, A., Glaser, W., Schöck, U., Stark, A., and Kuchler, K. (2012) A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet* **8**: e1003118.
- Homann, O.R., Dea, J., Noble, S.M., and Johnson, A.D. (2009) A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS Genet* **5**: e1000783.
- Huang, G., Srikantha, T., Sahni, N., Yi, S., and Soll, D.R. (2009) CO₂ regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr Biol* **19**: 330-334.
- Huber, A., French, S.L., Tekotte, H., Yerlikaya, S., Stahl, M., Perepelkina, M.P., Tyers, M., Rougemont, J., Beyer, A.L., and Loewith, R. (2011) Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L *EMBO J* **30**: 3052-64.
- Jacinto, E., and Lorberg, A. (2008) TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* **410**: 19-37.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., Davis, R.W., and Scherer, S. (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7329-7334.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* **18**: 2491-2505.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Bretkreutz, B.J., and Tyers, M. (2002) Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**: 395- 400.
- Jung, W.H., and Stateva, L.I. (2003) The cAMP phosphodiesterase encoded by *PDE2* is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology* **10**: 2961-2976.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509.
- Kaneko, A., Umeyama, T., Utena-Abe, Y., Yamagoe, S., Niimi, M., and Uehara, Y. (2006) Tcc1p, a novel protein containing the tetratricopeptide repeat motif, interacts with Tup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 1894-1905.
- Kannan, N., Haste, N., Taylor, S.S., and Neuwald, A.F. (2007) The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **23**: 1272-1277.

- Kelly, M.T., MacCallum, D.M., Clancy, S.D., Odds, F.C., Brown, A.J., and Butler, G. (2004) The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* **53**: 969-983.
- Klengel, T., Liang, W.J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J., Eckert, S.E., Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., Levin, L.R., Buck, J., and Mühlischlegel, F. (2005) Fungal adenylyl cyclases integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* **15**: 2021-2026.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009) Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 10171-10176.
- Kumamoto, C.A., and Vines, M.D. (2005) Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* **7**: 1546-1554.
- Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., and Soll, D.R. (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.
- Kvaal, C.A., Srikantha, T., and Soll, D.R. (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**: 4468-4475.
- la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**: 527-536.
- Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J., and Soll, D.R. (2003) Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* **71**: 4970-4976.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W., and Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14907-14912.
- Lassak, T., Schneider, E., Bussmann, M., Kurtz, D., Manak, J.R., Srikantha, T., Soll, D.R., and Ernst, J.F. (2011) Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Mol Microbiol* **82**: 602-618.
- Leon, C., Ruiz-Santana, S., Saavedra, P., Almirante, B., Nolla-Salas, J., Alvarez-Lerma, F., Garnacho-Montero, J., León, M.A., and EPCAN Study Group. (2006) A bedside scoring system („Candida score“) for early antifungal treatment in non-neutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med* **34**:730-737.
- Leuker, C.E., and Ernst, J.F. (1994) Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol Gen Genet* **245**: 212-217.

- Li, C.R., Wang, Y.M., De Zheng, X., Liang, H.Y., Tang, J.C., and Wang, Y. (2005) The formin family protein CaBni1p has a role in cell polarity control during both yeast and hyphal growth in *Candida albicans*. *J Cell Sci* **118**: 2637-2648.
- Liu, H., Köhler, J., and Fink, G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723-1726.
- Liu, W., Zhao, J., Li, X., Li, Y., and Jiang, L. (2010) The protein kinase CaSch9p is required for cell growth, filamentation and virulence in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **10**: 462-470.
- Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., and Soll, D.R. (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**: 737-745.
- Longen, S., Bien, M., Bihlmaier, K., Kloeppe, C., Kauff, F., Hammermeister, M., Westermann, B., Herrmann, J.M., and Riemer, J. (2009) Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol* **393**: 356-368.
- Lu, Y., Su, C., and Liu, H. (2012) A GATA transcription factor recruits Hda1 in response to reduced Tor1 signaling to establish a hyphal chromatin state in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **8**: e1002663.
- Lu, Y., Su, C., Mao, X., Raniga, P.P., Liu, H., and Chen, J. (2008) Efg1-mediated recruitment of NuA4 to promoters is required for hypha-specific Swi/Snf binding and activation in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **19**: 4260-4272.
- Manning G. (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook* **13**: 1-19.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934.
- Matsuo, Y., McInnis, B., and Marcus, S. (2008) Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **7**: 1450-1459.
- McCusker, J.H., and Davis, R.W. (1991) The use of prolin as a nitrogen source causes hypersensitivity to, and allows more economical use of 5FOA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 607-608.
- Monnin, E., Indermuhle, A., Dallenbach, A., Fluckiger, J., Stauffer, B., Stocker, T.F., Raynaud, D., and Barnola, J.M. (2001) Atmospheric CO₂ concentrations over the last glacial termination. *Science* **291**: 112-114.
- Moroianu, J. (1998) Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin beta family. *J Cell Biochem* **70**: 231-239.
- Morschhäuser, J., Michel, S., and Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* **32**: 547-556.

- Mulhern, S.M., Logue, M.E., and Butler, G. (2006) *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot Cell* **5**: 2001-2013.
- Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaiia, F., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F.C., and Brown, A.J. (2001a) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20**: 4742-4752.
- Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaiia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J., and Brown A.J. (2001b) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**: 981-993.
- Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A.P., Sensen, C.W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., Rigby, T., Benoit, F., Tessier, D.C., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2002) Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* **13**: 3452-3465.
- Negredo, A., Monteoliva, L., Gil, C., Pla, J., and Nombela, C. (1997) Cloning, analysis and one-step disruption of the *ARG5,6* gene of *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 297-302.
- Nguyen, A.N., Ikner, A.D., Shiozaki, M., Warren, S.M., and Shiozaki, K. (2002) Cytoplasmic localization of WisMAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spcl/Styl MAPK in fission yeast. *MolCell Bio* **13**: 2651-2663.
- Nizet, V., and Johnson, R.S. (2009) Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**: 609-617.
- Nobile, C.J., and Mitchell, A.P. (2005) Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol* **15**: 1150-1155.
- Nobile, C.J., Andes, D.R., Nett, J.E., Smith, F.J., Yue, F., Phan, Q.T., Edwards, J.E., Filler, S.G., and Mitchell, A.P. (2006) Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog* **2**: 636-649.
- Nobile, C.J., Fox, E.P., Nett, J.E., Sorrells, T.R., Mitrovich, Q.M., Hernday, A.D., Tuch, B.B., Andes, D.R., and Johnson, A.D. (2012) A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* **148**: 126-138.
- Noble, S.M., French, S., Kohn, L.A., Chen, V., and Johnson, A.D. (2010) Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet* **42**: 590-598.
- Noffz, C.S., Liedschulte, V., Lengeler, K., and Ernst, J.F. (2008) Functional mapping of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Eukaryot Cell* **7**: 881-893.
- Odds, F. C. (1988) *Candida* and Candidosis. 2nd Edition. Bailliere Tindall, London.
- Odds, F. C. (1994) Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**: 2-5.

- Park, H., Myers, C.L., Sheppard, D.C., Phan, Q.T., Sanchez, A.A., Edwards, J.E., and Filler, S.G. (2005) Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* **7**: 499-510.
- Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2007) The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *EMBO J* **26**: 3098-3108.
- Pearce, L.R., Komander, D. and Alessi, D.R. (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 9-22.
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C. (2003) TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell* **12**: 1607-1613.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- Pfaller, M.A. (1996) Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22**: S89-94.
- Pittet, D., Monod, M., Suter, P.M., Frenk, E., and Auckenthaler, R. (1994) *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* **220**: 751-758.
- Pokholok, D.K., Zeitlinger, J., Hannett, N.M., Reynolds, D.B., and Young, R.A. (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* **313**: 533-536.
- Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schröppel, K., and Ernst, J.F. (2005) *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560.
- Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005) The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev* **19**: 2534-2539.
- Pultz, D., Bennetzen, M.V., Rødkær, S.V., Zimmermann, C., Enserink, J.M., Andersen, J.S., and Færgeman N.J. (2012) Global mapping of protein phosphorylation events identifies Ste20, Sch9 and the cell-cycle regulatory kinases Cdc28/Pho85 as mediators of fatty acid starvation responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol BioSyst* **8**: 796-803.
- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. (2002) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5459-5463.
- Reagan, D.R., Pfaller, M.A., Hollis, R.J., and Wenzel, R.P. (1990) Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* **28**: 2733-2738.
- Rocha, C.R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **12**: 3631-3643.

- Roman, E., Cottier, F., Ernst, J.F. and Pla, J. (2009) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.
- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J.M., De Virgilio, C., De Moor, B., and Winderickx, J. (2005) PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* **55**: 862-880.
- Roy, B., Varshney, N., Yadav, V., and Sanyal, K. (2013) The process of kinetochore assembly in yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **338**: 107-117.
- San José, C., Monge, R.A., Perez-Diaz, R., Pla, J., and Nombela, C. (1996) The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 5850-5852.
- Sanglard, D., and Odds, F.C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**: 73-85.
- Santos, M.A., and Tuite, M.F. (1995) The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nuc Acids Res* **23**: 1481-1486.
- Sanyal, K. (2012) How do microbial pathogens make *CENs*? *PLoS Pathog* **8**: e1002463.
- Sanyal, K., Baum, M., and Carbon, J. (2004) Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11374-11379.
- Sanyal, K., and Carbon, J. (2002) The CENP-A homolog CaCse4p in the pathogenic yeast *Candida albicans* is a centromere protein essential for chromosome transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12969-12974.
- Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C. and Lopez-Ribot, J.L. (2003). Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **5**: 1053-1060.
- Setiadi, E. (2002) Charakterisierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase Rim15p des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Setiadi, E. (2006) Regulation der Morphogenese und der Genexpression von *Candida albicans* unter hypoxischen Bedingungen. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Setiadi, E.R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., and Ernst, J.F. (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**: 399-411.

- Shepard, J.R., Addison, R.M., Alexander, B.D., la-Latta, P., Gherna, M., Haase, G., Hall, G., Johnson, J.K., Merz, W.G., Peltroche-Llacsahuanga, H., Stender, H., Venezia, R.A., Wilson, D., Procop, G.W., Wu, F., and Fiandaca, M.J. (2008) Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* **46**: 50-55.
- Slutsky, B., Buffo, J., and Soll, D.R. (1985) High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**: 666-669.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., and Ernst, J.F. (1999) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**: 5514-5517.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., and Ernst, J.F. (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**: 386-396.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by DNA electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Staab, J.F., and Sundstrom, P. (2003) *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol* **11**: 69-73.
- Staib, P., and Morschhauser, J. (2005) Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol* **55**: 637-652.
- Stichthernoth, C. (2009) Hypoxische Adaptation des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Su, C., Lu, Y., and Liu, H. (2013) Reduced TOR signaling sustains hyphal development in *Candida albicans* by lowering Hog1 basal activity. *Mol Biol Cell* **24**: 385-389.
- Suckow, M., and 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.
- Sudbery, P.E. (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**: 737-748.
- Szafranski-Schneider, E., Swidergall, M., Cottier, F., Tielker, D., Román, E., Pla, J., and Ernst, J.F. (2012) Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **8**: e1002501.
- Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominquez, A., and Ernst, J.F. (2003) Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *J Mol Biol* **329**: 949-962.
- ter Linde, J.J., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 7409-7413.

- Thomas-Chollier, M., Sand, O., Turatsinze, J.V., Janky, R., Defrance, M., Vervisch, E., Brohée, S., and van Helden, J. (2008) RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **36**: W119-127.
- Towbin, H., Staelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N., and Loewith, R. (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**: 663-674.
- Üstün, Y. (2012) Hypoxische Regulation der Morphogenese und des *ACC1*-Gens bei *Candida albicans*. *Masterarbeit*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- van Helden, J., Rios, A.F., and Collado-Vides, J. (2000). Discovering regulatory elements in intergenic sequences by analysis of spaced dyads. *Nucleic Acids Res* **28**: 1808-1818.
- Vandeputte, P., Pradervand, S., Ischer, F., Coste, A.T., Ferrari, S., Harshman, K., and Sanglard, D. (2012) Identification and functional characterization of Rca1, a transcription factor involved in both antifungal susceptibility and host response in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **11**: 916-931.
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R., and De Virgilio, C. (2008) Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Mol Microbiol* **69**: 277-285.
- Ward, M.P., and Garrett, S. (1994) Suppression of a yeast cyclic AMP-dependent protein kinase defect by overexpression of *SOK1*, a yeast gene exhibiting sequence similarity to a developmentally regulated mouse gene. *Mol Cell Biol* **14**: 5619-5627.
- Warn, P.A., Sharp, A., Guinea, J., and Denning, D.W. (2004) Effect of hypoxic conditions on *in vitro* susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against *Aspergillus* and *Candida*. *J Antimicrob Chemother* **53**: 743-749.
- West, JB. (1985) *Respiratory Physiology - The Essentials*. 3rd Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F., and Wenzel, R.P. (1988) Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* **148**: 2642-2645.
- Wilson, R.B., Davis, D., Enloe, B.M., and Mitchell, A.P. (2000) A recyclable *Candida albicans* *URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* **16**: 65-70.
- Wilson, R.B., Davis, D., and Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Dogerty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Sunith, S.S., Micheal, M.Z., and Graha, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl Acids Res* **17**: 3469-3478.

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

Zacchi, L.F., Schulz, W.L., and Davis, D.A. (2010) *HOS2* and *HDA1* encode histone deacetylases with opposing roles in *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS One* **5**: e12171.

Zhang, A., and Gao, W. (2012) Mechanisms of protein kinase Sch9 regulating Bcy1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **331**: 10-16.

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

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

Zurita-Martinez, S.A., and Cardenas, M.E. (2005) Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth. *Eukaryot Cell* **4**: 63-71.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ak	Antikörper
bp	Basenpare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
ca.	circa
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CAPSO	3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure
<i>CEN</i>	Zentromer
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming units (Koloniebildende Einheiten)
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
chip	Microarray
Chr	Chromosom
Ct	Cycle threshold
C-terminal	carboxyterminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ePK	eukaryotische Proteinkinase
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i> (und andere)
5-FOA	5-Fluoroorotic Acid (5-Fluororotsäure)
FDR	false discovery rate
G	Guanin
g	Gramm
GO	Gen-Ontologie
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HM	hydrophobes Motiv
HOG	high osmolarity glycerol
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>
LB	lysogeny broth
LiAc	Lithiumacetat
LiCl	Lithiumchlorid
log	logarithmisch
M	Molar
MAP	mitogen activated protein
Mbp	Megabasenpaare
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
N	variable DNA-Base
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame
p.a.	per analysis
pers.	persönlich
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTS	relativer Transkriptspiegel
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SD	synthetisches Minimalmedium mit Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	saline sodium citrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOR	target of rapamycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol

TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumenprozent)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YP	Yeast extract-Pepton
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose
YPS	Yeast extract-Pepton-Saccharose
z.B.	zum Beispiel

9 Anhang

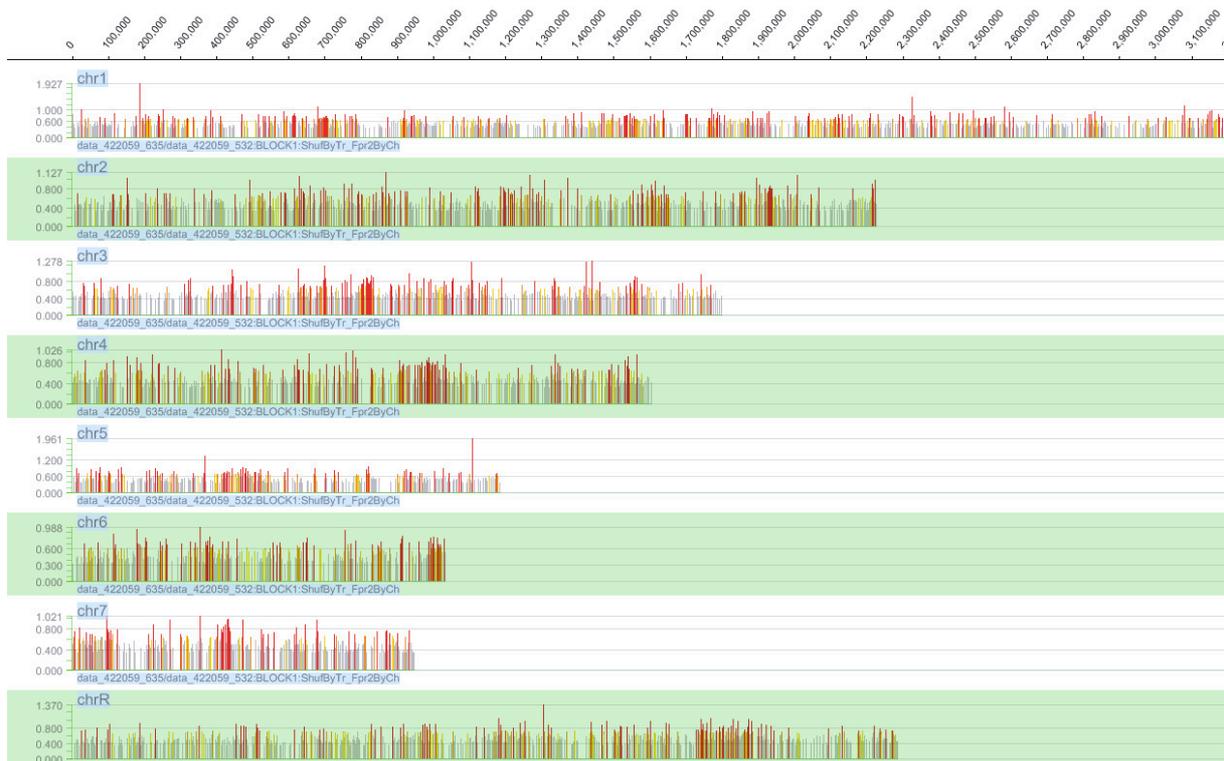


Abb. 9.1: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Bcy1 unter Hefewachstumsbedingungen. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Der Stamm AF1007 ($BCY1^{HA}/BCY1$) und der Kontrollstamm CAF2-1 ($BCY1/BCY1$) wurden in jeweils 50 ml YPD angezogen und bis zu einer OD_{600} von 1 bei 30 °C inkubiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. Zu sehen sind die Binderegionen von Bcy1 auf allen acht Chromosomen von *C. albicans*.

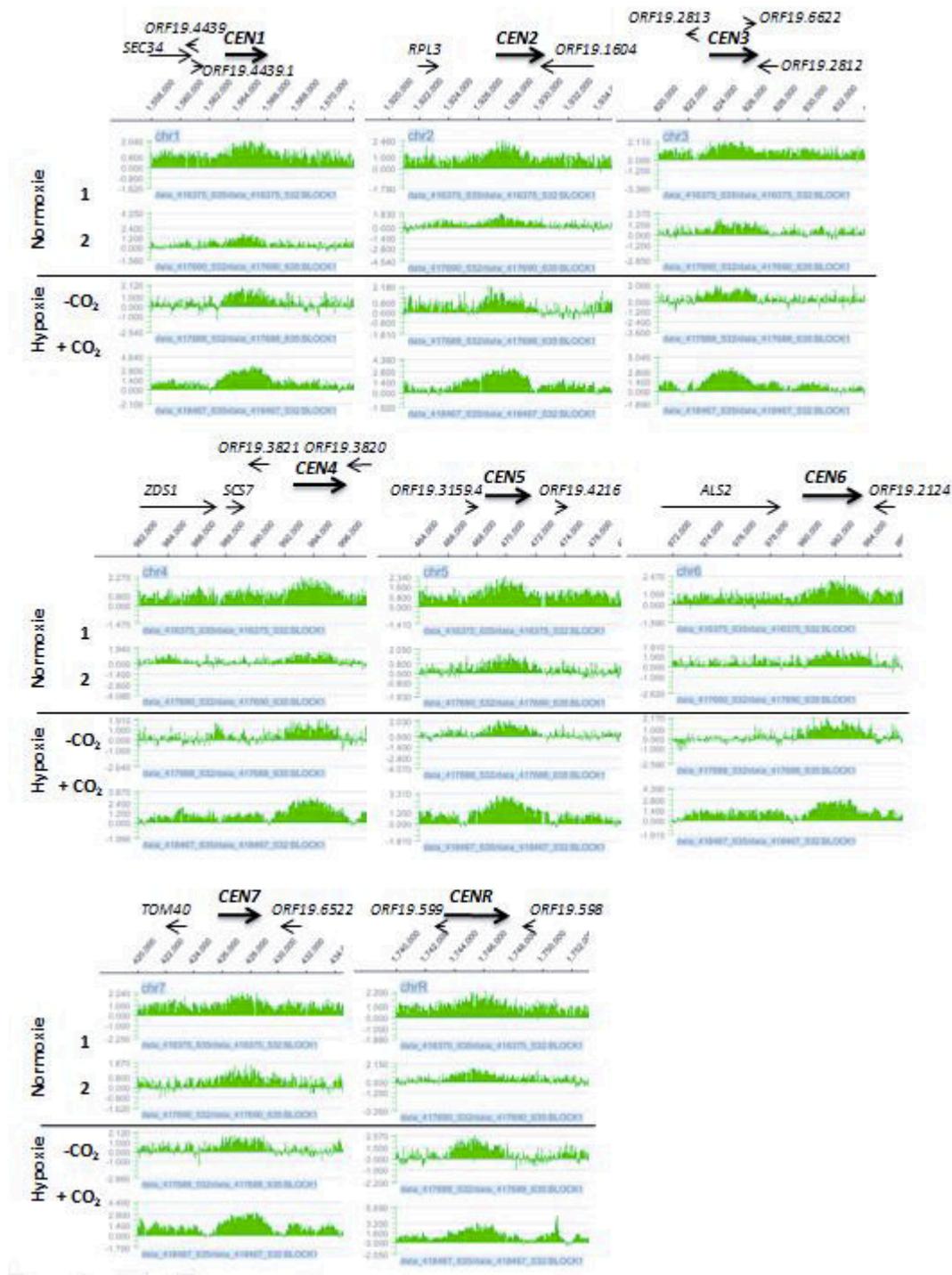


Abb. 9.2: Bindung von Sch9 an die Zentromerregionen von *C. albicans*. Ergebnisse der beiden ChIP-chip-Replikate unter normoxischen Bedingungen (1 und 2) sowie unter hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂) in Ab- (-CO₂) und Anwesenheit (+CO₂) von 6 % CO₂. Dargestellt sind die scaled log₂-ratio-Werte der genomischen Zentromerabschnitte (CEN1 bis CEN7 und CENR). Die Pfeile markieren die nächstgelegenen ORFs, die Pfeilrichtung gibt die Orientierung an.

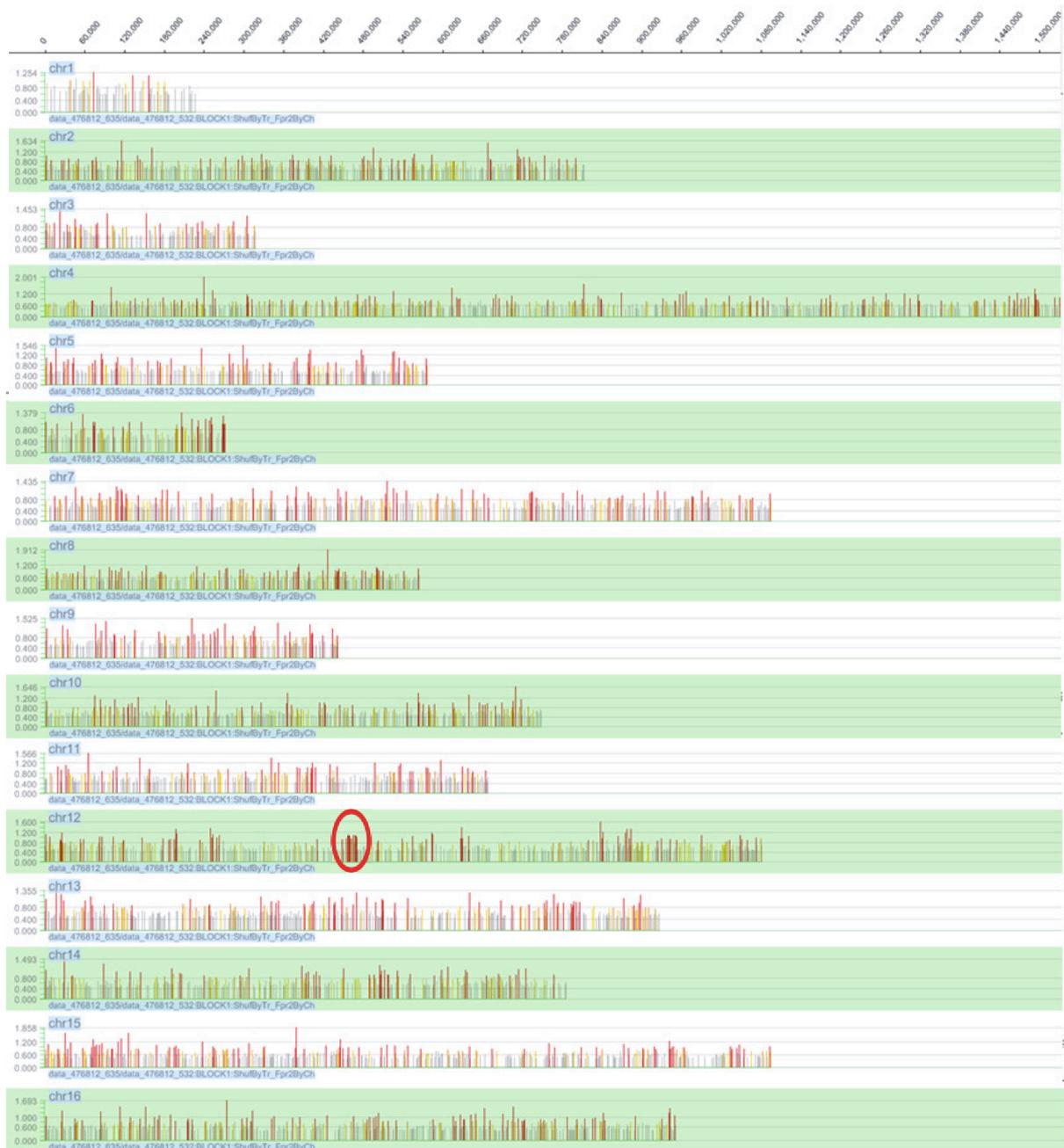


Abb. 9.3: Übersicht der genomweiten Binderegionen von Sch9 aus *S. cerevisiae*. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Arrays abgebildet. Die Stämme MAP85 (*SCH9^{HA}*) und W303-1A (Kontrolle) wurden in jeweils 50 ml YPD angezogen und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C inkubiert. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.8 beschrieben. Zu sehen sind die Binderegionen von Sch9 auf allen 16 Chromosomen von *S. cerevisiae*. Die Position des *RDN1*-Locus auf Chromosom 12 ist rot markiert.

Tab. 9.1: Bindung von Tpk1 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* in der Hefeform.

Chr	Binderegion	Größe (bp)	5'ORF	Genname	5'ORF Position	ebenfalls Binde-region von	3'ORF	Genname	3'ORF Position	ebenfalls Binde-region von
1	187..1250	1063					orf19.6115		4059 --> 4397	Tpk2 (Hefe)
1	3257..5378	2121	orf19.6115		4059 --> 4397	Tpk2 (Hefe)	orf19.6114		4409 <-- 4720	Tpk2 (Hefe)
1	1810693..1811569	876	orf19.5104	<i>LTP1</i>	1809023 <-- 1809691		orf19.5105		1810187 <-- 1813627	
1	2457462..2458401	939					orf19.2296		2457135 --> 2464790	Tpk2 (Hefe)
1	3171580..3174261	2681	orf19.7260		3171005 <-- 3171784	Tpk2 (Hefe)	orf19.7263		3173251 <-- 3174603	Tpk2 (Hefe) Bcy1 (Hefe)
			orf19.7261		3171846 <-- 3173195	Tpk2 (Hefe) Bcy1 (Hefe)	orf19.7264		3174695 --> 3175633	Tpk2 (Hefe) Tpk2 (Hyphe) Bcy1 (Hefe)
2	797780..800174	2912	orf19.844	<i>STE11</i>	795730 <-- 798202		orf19.843		798659 <-- 800845	
2	1612976..1614146	1170	orf19.2191		1612254 --> 1613291		orf19.2190	<i>VRP1</i>	1613343 <-- 1615337	Tpk2 (Hefe)
2	1890931..1891734	803					orf19.4084	<i>KIS1</i>	1891108 <-- 1892346	Tpk2 (Hyphe)
2	1942909..1944563	1654	orf19.1404		1942108 -->1943511		orf19.1403		1943675 <-- 1945393	
3	115..1686	1571					orf19.5475		3999 --> 4823	Tpk2 (Hefe)
3	23887..24592	705	orf19.5455		22745 <-- 23092	Tpk2 (Hefe)	orf19.5451		24430 --> 24810	Tpk2 (Hefe)
			orf19.5454	<i>DAL1</i>	23211 <-- 24971	Tpk2 (Hefe)				
3	1677956..1678994	1038					orf19.6763	<i>SLK19</i>	1677224 <-- 1680817	
5	436153..436551	398					orf19.3176	<i>RIM21</i>	435999 <-- 437588	
5	1026026..1029568	3542	orf19.3957		1024403 <-- 1025233		orf19.3959	<i>SSD1</i>	1025693 <-- 1029517	
6	972176..972852	676					orf19.1097	<i>ALS2</i>	971454 --> 978542	
7	23319..24411	1092	orf19.7106	<i>VPS70</i>	21072 --> 23375	Bcy1 (Hefe)	orf19.7105	<i>FAR1</i>	23536 --> 25842	
7	54961..55835	874	orf19.7086		52951 <-- 55866					
R	18571..19354	783	orf19.7538		14971 <-- 16827	Tpk2 (Hefe)	orf19.7534	<i>MIS12</i>	21385 --> 24462	Tpk2 (Hefe)
			orf19.7537	<i>BNR1</i>	16909 -->21366	Tpk2 (Hefe)				
R	1606470..1606774	304					orf19.6127	<i>LPD1</i>	1606104 <-- 1607579	Tpk2 (Hyphe)

R	1726442..1729833	3391	orf19.609		1725648 <-- 1725983		orf19.607		1726217 <-- 1729384	
R	1824060..1826899	2839	orf19.6414		1823664 <-- 1825586		orf19.6414.3	TPM2	1826988 --> 1827860	
R	1866988..1868794	1806	orf19.6440		1861847 <-- 1863991		orf19.6442	PRP8	1864470 --> 1871720	
R	1884755..1885823	1068	orf19.6450		1881876 --> 1882556	Tpk2 (Hefe)	orf19.6834.10	TAR1	1893804 <-- 1894073	Tpk2 (Hefe)
R	2268290..2270017	1727	orf19.7660	VPS52	2267538 <-- 2269109		orf19.7661	HMI1	2269233 --> 2271146	

Der Stamm AF1004, der HA-markiertes Tpk1 produziert sowie der Kontrollstamm II (*TPK1/tpk1*) wurden unter Hefewachstumsbedingungen angezogen. Die Chromatinimmunpräzipitation erfolgte wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben. Die Chromatinfragmente wurden fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans* „Whole Genome Tiling Array“ kohybridisiert. Aufgelistet sind die Binderegionen des Proteins auf den Chromosomen 1-7 und R sowie die nächstpositionierten ORFs. Liegen Binderegionen innerhalb einer kodierenden Region, wurde dies durch eine lila Schrift gekennzeichnet. Wurden ORFs ebenfalls unter anderen Bedingungen und/oder von anderen Proteinen gebunden, wurde dies ebenfalls notiert.

Tab. 9.2 Bindung von Tpk2 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* in der Hefeform.

Chr	Binderegion	Größe (bp)	5'ORF	Genname	5'ORF Position	ebenfalls Binde-region von	3'ORF	Genname	3'ORF Position	ebenfalls Binde-region von
1	635..1767						orf19.6115		4059 --> 4397	Tpk1 (Hefe)
1	2747..3136	389					orf19.6115		4059 --> 4397	Tpk1 (Hefe)
1	4308..5250	942	orf19.6115		4059 --> 4397	Tpk1 (Hefe)				
			orf19.6114		4409 <-- 4720	Tpk1 (Hefe)				
1	12667..15533	2866	orf19.6109	<i>TUP1</i>	12163 --> 13701		orf19.6102	<i>RCA1</i>	14910 <-- 15761	
			orf19.6105	<i>MVD</i>	13778 --> 14917		orf19.6103			
1	16545..17008	463					orf19.6100		16600 <-- 17328	
							orf19.6099	<i>CCT8</i>	17338 --> 18960	
1	17470..18680	1210	orf19.6100		16600 <-- 17328					
			orf19.6099	<i>CCT8</i>	17338 --> 18960					
1	21871..23082	1211	orf19.6094		19615..21714		orf19.6092	<i>KEL1</i>	22270 --> 25326	
1	23217..24267	1050	orf19.6092	<i>KEL1</i>	22270 --> 25326					
1	25585..26558	973	orf19.6091	<i>RIM8</i>	25381 <-- 27249					
1	273257..273530	273	orf19.3328		272385 <-- 274208	Tpk2 (Hyphe)				
1	445554..447878	2324	orf19.3669	<i>SHA3</i>	442472 <-- 444259	Tpk2 (Hyphe)				
1	530264..530948	684	orf19.2941	<i>SCW4</i>	530226 --> 531962					
1	630261..630622	361	orf19.2992	<i>RPP1A</i>	630252 --> 630572					
1	842172..842424	252	orf19.4475	<i>KTR4</i>	840435 <-- 841877		orf19.4476		842842 <-- 843876	
1	997686..997911	225	orf19.763		997365 --> 998039		orf19.762		998186 <-- 999297	
1	1303574..1304084	510	orf19.1826	<i>MDM34</i>	1300757 <-- 1302625		orf19.1825		1306306 --> 1308531	
1	1362509..1363314	805	orf19.6271		1361070 <-- 1363202		orf19.6269		1364477 --> 1367062	
1	1478315..1479190	875	orf19.6217	<i>PGA63</i>	1475717 --> 1479514	Tpk2 (Hyphe)				
1	1632976..1633205	229	orf19.2791	<i>BBC1</i>	1631898 <-- 1634762					
1	1640564..1640812	248	orf19.2787	<i>PRY1</i>	1639582 <-- 1640814					

1	1658794..1659109	315	orf19.2781		1651229 <-- 1653745		orf19.2779		1658949 --> 1659461	
1	1695307..1695760	453					orf19.4713		1696719 --> 1699295	Bcy1 (Hefe)
1	1784976..1785253	277	orf19.5094	<i>BUL1</i>	1780738 <-- 1782963		orf19.5095		1785424 <-- 1789380	
1	1792859..1793223	364	orf19.5097	<i>CAT8</i>	1790436 <-- 1793606		orf19.5098	<i>NTG1</i>	1794223 <-- 1795185	
1	1837986..1839277	1291	orf19.5117	<i>OLE1</i>	1834354 <-- 1835814		orf19.5118	<i>SDS24</i>	1839339 --> 1841225	
1	1840675..1841112	437	orf19.5118	<i>SDS24</i>	1839339 --> 1841225		orf19.382	<i>TEF2</i>	1842606 --> 1843982	
1	2175738..2176007	269					orf19.4863	<i>PDC2</i>	2175663 <-- 2178173	
1	2287838..2288081	243					orf19.4906		2287271 <-- 2289577	Bcy1 (Hefe)
1	2383998..2384679	681	orf19.2344	<i>ASR1</i>	2383556 <-- 2384713					
1	2457534..2458196	662	orf19.2296		2457135 --> 2464790	Tpk1 (Hefe)				
1	2461502..2461841	339	orf19.2296		2457135 --> 2464790	Tpk1 (Hefe)				
1	2461944..2463451	1507	orf19.2296		2457135 --> 2464790	Tpk1 (Hefe)				
1	2463794..2464119	325	orf19.2296		2457135 --> 2464790	Tpk1 (Hefe)				
1	2472983..2473642	659	orf19.676		2472723 --> 2473619					
1	2475800..2476195	395	orf19.675		2475597 --> 2476235		orf19.674		2476813 --> 2477904	
1	2513766..2514202	436					orf19.657	<i>SAM2</i>	2513620 <-- 2514777	
1	2534345..2534640	295					orf19.1166	<i>CTA3</i>	2534209 <-- 2538201	
1	2534969..2535693	724					orf19.1166	<i>CTA3</i>	2534209 <-- 2538201	
1	2538884..2539156	272	orf19.1164	<i>GAR1</i>	2538599 --> 2539159					
1	2782800..2783196	396	orf19.6345	<i>RPG1A</i>	2782583 --> 2785375					
1	2809936..2810213	277	orf19.4921		2807971 --> 2810142		orf19.4921.1		2812003 --> 2812167	
1	2905475..2905797	322	orf19.4959		2904999 <-- 2906720					
1	2957476..2957786	310	orf19.4980	<i>HSP70</i>	2955762 --> 2957732					
1	3107374..3108019	645	orf19.7217	<i>RPL4B</i>	3106779 <-- 3107870					
1	3118615..3120761	2146	orf19.7221	<i>SET3</i>	3115551 <-- 3118760	Tpk2 (Hyphe)	orf19.7223		3121139 --> 3122893	
			orf19.7222	<i>PAM16</i>	3119961 <-- 3120326	Tpk2 (Hyphe)				
1	3144474..3145148	674	orf19.7236	<i>TIF35</i>	3144291 <-- 3145130		orf19.7237		3145510 --> 3146313	
1	3148502..3149340	838	orf19.7239	<i>MDG1</i>	3148098 <-- 3150328					
1	3167936..3168681	745					orf19.7257	<i>MLH3</i>	3167811 <-- 3169721	

1	3171850..3174607	2865	orf19.7260	<i>TIF35</i>	3171005 <-- 3171784	Tpk1 (Hefe)	orf19.7263		3173251 <-- 3174603	Tpk1 (Hefe) Bcy1 (Hefe)
			orf19.7261		3171846 <-- 3173195	Tpk1 (Hefe) Bcy1 (Hefe)	orf19.7264		3174695 --> 3175633	Tpk1 (Hefe) Tpk2 (Hyphe) Bcy1 (Hefe)
1	3175054..3178051	2997	orf19.7264		3174695 --> 3175633	Tpk1 (Hefe) Tpk2 (Hyphe) Bcy1 (Hefe)	orf19.7267	<i>SAM35</i>	3176785 <-- 3177540	Tpk2 (Hyphe)
			orf19.7265		3175688 --> 3176416	Tpk2 (Hyphe)	orf19.7269		3177598 <-- 3178260	Tpk2 (Hyphe)
			orf19.7266		3176504 --> 3176818	Tpk2 (Hyphe)				
2	6936..8698	1762	orf19.1923	<i>RRN3</i>	5665 --> 7335		orf19.1920		7510 <-- 8043	
							orf19.1917		8144 <-- 9289	
2	12365..12898	533	orf19.1914	<i>FAV3</i>	11100 <-- 12443		orf19.1913		12627 --> 13253	
2	184633..184937	304	orf19.2012	<i>NOT3</i>	183563 --> 185798					
2	268480..268741	261	orf19.1453	<i>SPT5</i>	65953 --> 68823					
2	330701..331076	375	orf19.1490	<i>MSB2</i>	327699 --> 331928	Tpk2 (Hyphe)				
2	341832..342875	1043	orf19.1494	<i>RAD23</i>	341240 --> 342678		orf19.1495		342834 <-- 343631	
2	587031..587894	863	orf19.5811	<i>MET1</i>	586227 --> 587912		orf19.5809		588237 --> 589598	
2	588075..590248	2173	orf19.5809		588237 --> 589598		orf19.5808		589898 <-- 591118	
2	703670..704800	1130	orf19.886	<i>PAN1</i>	702830 --> 707023					
2	706747..707728	981	orf19.886	<i>PAN1</i>	702830 --> 707023		orf19.882	<i>HSP78</i>	707180 <-- 709618	
2	719604..720135	531	orf19.876	<i>PGA33</i>	719652 --> 720392					
2	824333..824597	264	orf19.831		823077 <-- 824594					
2	1190003..1190374	371	orf19.5204		1189319 --> 1190956					
2	1473511..1473849	338					orf19.2280	<i>ZCF10</i>	1473350 <-- 1476115	
2	1613826..1614880	1054	orf19.2190	<i>VRP1</i>	1613343 <-- 1615337	Tpk1 (Hefe)				
2	1697509..1697786	277	orf19.1433.1		1696732 <-- 1696851		orf19.3639		1699324 --> 1700388	
2	1964164..1964532	368	orf19.1395		1962161 <-- 1963177	Tpk2 (Hyphe)				
2	2122034..2122495	461	orf19.1750	<i>SLR1</i>	2120962 --> 2122595		orf19.1748		2122825 <-- 2124870	
2	2155536..2155941	405	orf19.3490	<i>FGR6-4</i>	2153146 --> 2153146		orf19.5316	<i>FGR29</i>	2156749 <-- 2159079	

2	2196485..2197122	637	orf19.5345		2196208 --> 2197227		orf19.5346		2197387 --> 2198598	
2	2224606..2225781	1175	orf19.5368		2223060 <-- 2225673					
3	3909..4964	1055	orf19.5475		3999 --> 4823	Tpk1 (Hefe)	orf19.5474		3828 --> 4880	
							orf19.5469		4903 <-- 8097	
3	5407..7988	2581	orf19.5474		3828 --> 4880		orf19.5472		5971 --> 7002	
			orf19.5469		4903 <-- 8097					
3	17779..18190	411	orf19.5474		3828 --> 4880		orf19.5463	SEC6	17074 <-- 19533	Tpk2 (Hyphe)
3	19653..20584	931	orf19.5463	SEC6	17074 <-- 19533	Tpk2 (Hyphe)	orf19.5461		20107 --> 20643	Tpk2 (Hyphe)
			orf19.5462		19605 --> 20204	Tpk2 (Hyphe)	orf19.5459		19602 <-- 21179	Tpk2 (Hyphe)
3	20695..21704	1009	orf19.5459		19602 <-- 21179	Tpk2 (Hyphe)	orf19.5457		21254 <-- 22687	
3	23663..24740	1077	orf19.5455		22745 <-- 23092	Tpk1 (Hefe)	orf19.5451		24430 --> 24810	Tpk1 (Hefe)
			orf19.5454	DAL1	23211 <-- 24971	Tpk1 (Hefe)				
3	270471..271380	909					orf19.1725		269415 <-- 271592	
3	415558..415826	268	orf19.1658		414753 <-- 416640					
3	622490..622837	347	orf19.280		62378 <-- 622788		orf19.281		623047 --> 624144	
3	623677..624725	1048	orf19.281		623047 --> 624144		orf19.284		624286 --> 624942	
3	637848..639131	1283	orf19.295		637036 <-- 638133		orf19.297	DTD2	638901 <-- 639473	
			orf19.296		638390 --> 638800					
3	731377..731832	455	orf19.342	BMT7	728992 <-- 730947					
3	853750..854082	332	orf19.918	CDR11	848775 <-- 853313		orf19.913.2		855056 --> 855582	
3	888466..889131	665	orf19.5870	CTP1	887091 <-- 888046					
3	892377..892729	352	orf19.5871	SNF5	890970 <-- 893060					
3	986003..986334	331					orf19.5924	ZCF31	985124 --> 988516	Bcy1 (Hefe)
3	993219..993462	243	orf19.5928	RPP2B	993119 --> 993454	Bcy1 (Hefe)				
3	1279250..1279773	523	orf19.7350	RCT1	1279189 --> 1279764					
3	1344212..1344634	422	orf19.7378		1343440 <-- 1345056					
3	1351408..1351678	270	orf19.7380		1349946 <-- 1352462	Tpk2 (Hyphe)				
3	1464368..1464643	275	orf19.7433		1463642 --> 1466932					
3	1464712..1465794	1082	orf19.7433		1463642 --> 1466932					

3	1555084..1555341	257					orf19.6820		1554786 <-- 1556333	
3	1624448..1624736	288					orf19.6790		1623865 <-- 1626528	
3	1769872..1770105	233					orf19.6171		1768972 <-- 1771524	
3	1776527..1777201	674	orf19.6178	<i>FBP1</i>	1776156 --> 1777151		orf19.6179		1776231 <-- 1776923	
							orf19.6180		1777226 --> 1778536	
3	1777919..1779706	1787	orf19.6180		1777226 --> 1778536		orf19.6182	<i>ZCF34</i>	1778523 <-- 1780655	
			orf19.6181		1778652 --> 1778957					
3	1782642..1783828	1186	orf19.6186		1781451 <-- 1782515		orf19.6187		1782397 --> 1784422	
			orf19.6185		1782397 --> 1783320		orf19.6188		1783351 <-- 1783668	
3	1794555..1794850	295	orf19.6191	<i>TLO8</i>	1787713 <-- 1788222	Tpk2 (Hyphe)				
3	1795837..1796497	660	orf19.6192		1795917 <-- 1796318					
4	3434..4861	1427	orf19.364		2845 --> 3891		orf19.366		3894 <-- 4904	
							orf19.367	<i>CNH1</i>	5033 --> 7435	
4	5230..6906	1676	orf19.366		3894 <-- 4904		orf19.367	<i>CNH1</i>	5033 --> 7435	
4	10005..10532	527	orf19.374		8937 <-- 11315					
4	13342..14233	891	orf19.377	<i>PHR3</i>	12792 --> 14307					
4	19960..20411	451	orf19.5636	<i>RBT5</i>	19713 --> 20438					
4	24985..25306	321	orf19.5640	<i>PEX5</i>	23853 <-- 25631					
4	46762..47115	353	orf19.5657	<i>SWI1</i>	45137 <-- 48100					
4	102289..102687	398	orf19.4184		101597 <-- 103606					
4	106179..106780	601	orf19.4183	<i>MUC1</i>	104422 <-- 107085		orf19.4182		107346 --> 108402	
4	171680..172581	901	orf19.4699		169448 <-- 171505		orf19.4698	<i>PTC8</i>	174443 --> 175708	
4	471090..471423	333	orf19.2767	<i>PGA59</i>	471123 <-- 471464	Tpk2 (Hyphe)				
4	477666..478325	659	orf19.2767	<i>PGA59</i>	471123 <-- 471464	Tpk2 (Hyphe)	orf19.2766		479521 --> 479829	Tpk2 (Hyphe)
4	554051..555002	951	orf19.2731		5553228 <-- 553566		orf19.2730		553938 --> 555758	
4	596237..596507	270					orf19.2709	<i>ZUO1</i>	596085 <-- 597368	
4	624556..624865	309	orf19.2691		624374 <-- 625096	Bcy1 (Hefe)				
4	628082..628407	325					orf19.2690		627864 --> 630557	Tpk2 (Hyphe) Bcy1 (Hefe)

4	687443..687757	314					orf19.2664		686743 --> 689441	
4	1030605..1031016	411					orf19.3799		1033344 --> 1034444	
4	1208755..1209138	383					orf19.1235	HOM3	1210282 --> 1211916	
4	1438795..1439706	911					orf19.2886	CEK1	1437788 <-- 1439056	
4	1441246..1441626	380	orf19.2886	CEK1	1437788 <-- 1439056					
4	1497958..1498233	275					orf19.3138	NOP1	1497965 --> 1498915	
4	1591478..1593291	1813	orf19.3080		1590765 <-- 1593905					
4	1594531..1596067	1536	orf19.3077	VID21	1594501 <-- 1596561	Tpk2 (Hyphe)	orf19.3076		1596736 --> 1597134	Tpk2 (Hyphe)
4	1601774..1603456	1682	orf19.3073		1603087 --> 1603443					
5	4360..6159	1799	orf19.5698		3999 --> 4808		orf19.5693		4830 <-- 6473	
							orf19.5694		6532 --> 7230	
5	6811..8312	1501	orf19.5694		6532 --> 7230		orf19.5692		7209 <-- 8807	
5	66400..66586	186	orf19.954		64733 <-- 66052		orf19.953.1	COF1	67605 --> 68261	
5	84138..84439	301	orf19.943	FET33	82117 <-- 83979		orf19.942	KRE62	84396 <-- 86237	
5	136258..136495	237	orf19.930	PET9	134740 --> 135645	Tpk2 (Hyphe)	orf19.929		137597 <-- 138904	Tpk2 (Hyphe)
5	371061..371512	451	orf19.6294	MYO1	362691 <-- 368537		orf19.3208	DAL52	375493 --> 377133	
5	518930..519309	379					orf19.4242	CST20	517901 <-- 521587	
5	676606..677025	419					orf19.4334	PGA58	676508 <-- 677230	
5	730477..731074	597	orf19.2657		726085 <-- 728208		orf19.2655	BUB3	731837 --> 732958	
5	809127..810062	935					orf19.6676		809408 --> 810307	
5	859225..859544	319	orf19.3220		858541 <-- 859146		orf19.3219		859577 <-- 861382	Tpk2 (Hyphe)
5	965562..965725	163	orf19.3923	PGA37	965202 <-- 965828					
5	1054421..1054762	341					orf19.3969	SFL2	1053870 --> 1056014	
5	1134330..1134794	464	orf19.4009	CNB1	1132855 <-- 1133376		orf19.4010	PAN3	1133879 --> 1135975	
5	1165975..1166520	545					orf19.4035	PGA4	1165960 <-- 1167315	
5	1170244..1170763	519					orf19.4040	ILV3	1169517 <-- 1171286	
5	1174078..1174546	468	orf19.4043		1172694 <-- 1174952					
5	1176957..1177930	973	orf19.4046		1175955 <-- 1176416		orf19.4045	EST1	1176415 --> 1178253	
5	1178057..1179988	1931	orf19.4045	EST1	1176415 --> 1178253		orf19.4051	HTS1	1179456 <-- 1180961	

			orf19.4048	<i>DES1</i>	1178347 --> 1179459					
6	7294..7979	685					orf19.6336	<i>PGA25</i>	7282 <-- 9900	
6	11619..12557	938	orf19.6329		10266 <-- 11351		orf19.6327	<i>HET1</i>	11956 <-- 12549	
			orf19.6328		11586 --> 11954					
6	23831..24474	643	orf19.1180		23430 --> 24677					
6	24913..26551	1638	orf19.1181		24885 --> 25973		orf19.1182		25968 <-- 26861	
							orf19.1183		27005 --> 228651	
6	26713..28693		orf19.1182		25968 <-- 26861		orf19.1183		27005 --> 28651	
6	40506..41973	1467	orf19.1189		39779 --> 41833					
6	330394..332001	1607	orf19.3427		330186 --> 330536		orf19.3426	<i>ANB1</i>	331257 --> 332450	
6	544211..544422	211	orf19.5536		541743 <-- 543461					
6	809773..809974	201					orf19.5749	<i>SBA1</i>	809661 <-- 810326	
6	838696..839115	419					orf19.5760	<i>IHD1</i>	838462 <-- 839640	Tpk2 (Hyphe)
6	860415..860928	513	orf19.5773		857571 --> 859673		orf19.5775		863241 <-- 864779	
6	1016214..1016581	367	orf19.2150		1015905 --> 1016894	Tpk2 (Hyphe)				
6	1023088..1024136	1048	orf19.2157	<i>DAC1</i>	1022223 --> 1023464		orf19.2158	<i>NAG3</i>	1023473 <-- 1025158	
7	1312..1627	315					orf19.7124	<i>RVS161</i>	1246 <-- 2040	
7	2052..2889	837	orf19.7124	<i>RVS161</i>	1246 <-- 2040		orf19.7121		2747 <-- 3421	
			orf19.7123		2278 --> 2769					
7	3716..4249	533	orf19.7121		2747 <-- 3421		orf19.7119	<i>RAD3</i>	3464 <-- 5761	
7	7580..8872	1292	orf19.7116		6523 <-- 7476		orf19.7115	<i>SAC7</i>	7583 <-- 9430	
7	10494..11307	813					orf19.7114	<i>CSA1</i>	10024 <-- 13080	
7	47377..47672	295	orf19.7091		47152 <-- 47988					
7	136175..136457	282					orf19.7044	<i>RIM15</i>	137282 --> 143053	
7	212024..212711	687	orf19.7014		211827 <-- 212739		orf19.7015	<i>RPP0</i>	211801 --> 212739	
							orf19.7013		212898 --> 214127	
7	228044..228521	477	orf19.7006		223296 <-- 226653	Bcy1 (Hefe)				
7	527530..527799	269	orf19.6465		526552 <-- 527907		orf19.6464		529027 --> 530880	
7	589486..589861	375					orf19.5190		590363 --> 590788	

7	604595..605637	1042	orf19.5181	<i>NIK1</i>	601548 --> 604793		orf19.5180	<i>PRX1</i>	605347 --> 606078	
7	619945..620218	273	orf19.5175		617642 <-- 621061					
7	761454..761842	388	orf19.1331	<i>HSM3</i>	758557 <-- 759975		orf19.1330		762348 --> 764168	
7	789024..789535	511	orf19.6687		784229 <-- 786232		orf19.6688		789512 --> 790492	
7	861462..861745	283	orf19.7188	<i>RPP1B</i>	861443 <-- 861769	Tpk2 (Hyphe)				
7	883582..883877	295	orf19.7170		883500 <-- 883889					
7	936923..939787	1578	orf19.7136	<i>SPT6</i>	934914 --> 939119		orf19.7131		939116 <-- 940339	
							orf19.7130		940494 --> 940895	
R	10706..11820	1114	orf19.7539.1		10646 <-- 11815					
R	14912..16287	1375	orf19.7538		14971 <-- 16827	Tpk1 (Hefe)	orf19.7537	<i>BNR1</i>	16909 --> 21366	Tpk1 (Hefe)
R	18011..19650	1639	orf19.7538		14971 <-- 16827	Tpk1 (Hefe)	orf19.7537	<i>BNR1</i>	16909 --> 21366	Tpk1 (Hefe)
R	23919..24224	305	orf19.7534	<i>MIS12</i>	21385 --> 24462	Tpk1 (Hefe)				
R	252806..253157	351	orf19.3243	<i>SRP54</i>	251463 --> 253133					
R	510571..511549	978	orf19.3740	<i>PGA23</i>	510505 --> 511397		orf19.3738	<i>PGA22</i>	511782 --> 512291	
R	561932..562115	183					orf19.171	<i>DBP2</i>	561933 --> 564684	
R	762225..763381	1156					orf19.4384	<i>HXT5</i>	762145 --> 763933	
R	792180..793314	1134	orf19.4401	<i>YVH1</i>	790131 <-- 791099					
R	865551..866956	1405	orf19.465	<i>IFF9</i>	866462 --> 869287					
R	886794..887139	345					orf19.470		885991 <-- 888243	
R	982108..982458	350	orf19.535	<i>RBR1</i>	982099 <-- 982434					
R	1257044..1257265	221	orf19.454	<i>SFL1</i>	1255743 <-- 1258160	Tpk2 (Hyphe)				
R	1346322..1346618	296	orf19.3888.2		1346101 <-- 1346388					
R	1553792..1554096	304	orf19.9		1553265 <-- 1554425					
R	1712047..1712376	329	orf19.3715	<i>ASF1</i>	1708914 <-- 1709657		orf19.612		1712520 --> 1713512	
R	1723831..1725033	1202					orf19.610	<i>EFG1</i>	1723589 --> 1725166	Tpk1 (Hyphe)
R	1750674..1752290	1616	orf19.597		1749721 <-- 1751403	Bcy1 (Hefe)	orf19.596.2	<i>DAD4</i>	1752120 --> 1752438	
R	1800978..1804000	3022	orf19.6398		1801066 <-- 1802223		orf19.6399	<i>ATS1</i>	1802855 --> 1803757	
R	1808873..1809156	283	orf19.6403.1	<i>RPP2A</i>	1808820 <-- 1809491		orf19.6404	<i>GSH2</i>	1810357 --> 1811814	

R	1839904..1840382	478	orf19.6420	<i>PGA13</i>	1838917 --> 1840287					
R	1884493..1884992	499	orf19.6450		1881876 --> 1882556	Tpk1 (Hefe)	orf19.6834.10	<i>TAR1</i>	1893804 <-- 1894073	Tpk1 (Hefe)
R	1889199..1889556	357	orf19.6450		1881876 --> 1882556	Tpk1 (Hefe)	orf19.6834.10	<i>TAR1</i>	1893804 <-- 1894073	Tpk1 (Hefe)
R	1890125..1892222	2097	orf19.6450		1881876 --> 1882556	Tpk1 (Hefe)	orf19.6834.10	<i>TAR1</i>	1893804 <-- 1894073	Tpk1 (Hefe)
R	1893013..1897588	4575	orf19.6834.10	<i>TAR1</i>	1893804 <-- 1894073	Tpk1 (Hefe)	orf19.7279.1		1898635 --> 1898898	
R	2031042..2031237	195	orf19.6610		2029141 <-- 2031915					
R	2034134..2034369	235	orf19.6608		2033492 <-- 2034660					
R	2046001..2046236	235	orf19.6601		2045083 <-- 2046291	Tpk1 (Hyphe)				
R	2107448..2108096	648	orf19.7561	<i>DEF1</i>	2106215 --> 2108878					
R	2197660..2198005	345	orf19.7606		219624 --> 2198115					
R	2265055..2265773	718	orf19.7655	<i>RPO21</i>	2260510 --> 2265696		orf19.7657	<i>POP3</i>	2265749 --> 2266495	
R	2279027..2279970	943	orf19.7670		2278617 <-- 2281388	Tpk2 (Hyphe)				
R	2281721..2282968	1247	orf19.7672		2281481 <-- 2282476	Tpk2 (Hyphe)	orf19.7673		2282567 --> 2282917	
							orf19.7675		2282948 <-- 2283424	
R	2282767..2284617	1850	orf19.7673		2282567 --> 2282917		orf19.7676	<i>XYL2</i>	2283524 <-- 2284606	
			orf19.7675		2282948 <-- 2283424					
R	2285465..2286020	555	orf19.7678		2284895 <-- 2285380		orf19.7680	<i>CTA26</i>	2285529 <-- 2286350	

Der Stamm AF1005, der HA-markiertes Tpk2 produziert sowie der Kontrollstamm TPK7 (*TPK2/tpk2*) wurden unter Hefewachstumsbedingungen angezogen. Die Chromatinimmunpräzipitation erfolgte wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben. Die Chromatinfragmente wurden fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans* „Whole Genome Tiling Array“ kohybridisiert. Aufgelistet sind die Binderegionen des Proteins auf den Chromosomen 1-7 und R sowie die nächstpositionierten ORFs. Liegen Binderegionen innerhalb einer kodierenden Region, wurde dies durch eine lila Schrift gekennzeichnet. Eine Grüne Unterlegung zeigt, dass mehr als eine Binderegion in der Nähe des ORFs gelegen ist. Wurden ORFs ebenfalls unter anderen Bedingungen und/oder von anderen Proteinen gebunden, wurde dies ebenfalls notiert.

Tab. 9.3: Bindung von Bcy1 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* in der Hefeform.

Chr	Binderegion	Größe (bp)	5'ORF	Genname	5'ORF Position	ebenfalls Binde-region von	3'ORF	Genname	3'ORF Position	ebenfalls Binde-region von
1	319913..320378	465					orf19.3349		319681 <-- 323385	
1	469547..469709	162					orf19.3681		469144 --> 471771	Tpk2 (Hyphe)
1	470800..471155	355	orf19.3681		469144 --> 471771	Tpk2 (Hyphe)				
1	516708..516910	202	orf19.2930		515635 <-- 517581					
1	684568..685442	874	orf19.3021		683972 --> 685176		orf19.3022		685483 --> 686415	
1	728720..729778	1058	orf19.3048		727188 <-- 730160					
1	754683..755076	393	orf19.3062		752851 --> 756390					
1	1537153..1538508	1355	orf19.4450	ZCF23	1536764 <-- 1538464	Tpk2 (Hyphe)	orf19.4449		1540755 --> 1541501	Tpk2 (Hyphe)
1	1550368..1551123	755	orf19.4445		1549838 --> 1551466					
1	1555836..1556797	961	orf19.4442	ALG9	1554303 <-- 1555985		orf19.4441		1556170 <-- 1557966	
1	1697264..1698311	1047	orf19.4713		1696719 --> 1699295	Tpk2 (Hefe)				
1	1777161..1777500	339	orf19.5089	TERT	1774856 <-- 1777459		orf19.5090		1777650 --> 1778630	
1	1930346..1930527	181	orf19.4746	JIP5	1929099 <-- 1930727		orf19.4747	HEM14	1931411 --> 1933006	
1	2158892..2159244	352	orf19.4850		2156090 <-- 2157940		orf19.4851	TFA1	2158787 <-- 2159971	
1	2288787..2289514	727					orf19.4906		2287271 <-- 289577	Tpk2 (Hefe)
1	2528500..2528734	234					orf19.1170	ARO7	2528538 <-- 2529344	
1	3093609..3094475	866	orf19.7212		3091220 --> 3093523		orf19.7213		3093525 <-- 3096896	
1	3143030..3143471	441					orf19.7235		3141075 <-- 3143753	
1	3173264..3174962	1698	orf19.7261		3171846 <-- 3173195	Tpk1 (Hefe) Tpk2 (Hefe)	orf19.7264		3174695 --> 3175633	Tpk1 (Hefe) Tpk2 (Hefe) Tpk2 (Hyphe)
			orf19.7263		3173251 <-- 3174603	Tpk1 (Hefe) Tpk2 (Hefe)				
2	634297..636983	2686	orf19.5782		634021 <-- 636276		orf19.5780		636587 <-- 638608	
2	773203..773553	350					orf19.853	SAP99	773182 --> 774273	

2	859692..860770	2078	orf19.813		858692 --> 860770				
2	923123..923797	674					orf19.4511		922654 --> 924717
2	928735..929852	1117	orf19.4509		928713 --> 929033		orf19.4507		930016 --> 930831
			orf19.4508		929080 --> 929727				
2	1209194..1211438	2244	orf19.5213		1208528 --> 1210972		orf19.5213.1	COX8	1211238 <-- 1211519
2	1273830..1274107	277	orf19.5487	CDC46	1272714 <-- 1274900		orf19.5488		1275300 --> 1275815
2	1353174..1353480	306	orf19.1295	VAS1	1350991 <-- 1354350				
2	1399759..1400742	983	orf19.2236	FHL1	1398143 <-- 1401601				
2	1604943..1605240	297	orf19.2193	PRS5	1604375 --> 1605715				
2	1643335..1645717	2382	orf19.2175		1642904 --> 1644007		orf19.2173	MAF1	1646206 --> 1647533
			orf19.2174	RAD57	1644238 --> 1645773				
2	1830866..1831331	465					orf19.206		1830690 <-- 1833836
2	1854912..1855703	791					orf19.4066		1854382 <-- 1856793
2	1862385..1862809	424	orf19.4068		1860281 <-- 1862569		orf19.4069		1862599 <-- 1863063
2	1931231..1932381	1150	orf19.1604		1930310 <-- 1933514				
2	1936262..1937272	1010	orf19.1604		1930310 <-- 1933514		orf19.1605	PMS1	1936617 <-- 1939349
2	1988063..1988635	572	orf19.1377	IPK2	1987955 <-- 1989007				
3	322795..323150	355	orf19.1698		320919 --> 322817		orf19.1697		322944 <-- 324005
3	441630..442835	1205	orf19.1647		441623 <-- 442730		orf19.1646		442964 --> 445489
3	701176..701460	284	orf19.332		699717 <-- 701822				
3	973416..973666	250	orf19.5917	STP3	969054 <-- 970364		orf19.5917.3		973882 --> 975468
3	986669..987386	717	orf19.5924	ZCF31	985124 --> 988516	Tpk2 (Hefe)			
3	993155..993788	633	orf19.5928	RPP2B	993119 --> 993454	Tpk2 (Hefe)	orf19.5929		993572 <-- 994594
3	1188441..1188619	178					orf19.6973		1186970 <-- 1190746
3	1329520..1330241	721	orf19.7372	MRR1	1329371 --> 1332697				
3	1334297..1334539	242					orf19.7374	CTA4	1333933 --> 1336983
3	1739885..1740465	580	orf19.6727	RIT1	1739189 <-- 1740502		orf19.6726		1740571 <-- 1741569
4	179603..180057	454					orf19.4697	MDN1	176061 <-- 191174
4	265123..265360	237	orf19.4657		263911 --> 265413		orf19.4656		266125 --> 268023

4	284817..285763	946	orf19.4649	ZCF27	283245 --> 286835					
4	625483..626502	1019	orf19.2691		624374 <-- 625096	Tpk2 (Hefe)	orf19.2690			Tpk2 (Hefe) Tpk2 (Hyphe)
4	775503..775894	391	orf19.1313	CDR3	773035 <-- 774255		orf19.1311	SPO75	782925 --> 785510	
4	914395..915195	800	orf19.1421		913834 --> 914475		orf19.1418	SEC15	915503 --> 918181	
			orf19.1420		914503 <-- 915330					
4	957612..958231	619	orf19.3840		954788 <-- 959014					
4	986137..986443	306	orf19.3823	ZDS1	982303 --> 987240					
4	1075662..1075898	236	orf19.3775	SSK2	1071964 <-- 1076415		orf19.3774.1		1077301 --> 1077522	
4	1493041..1493668	627	orf19.3141		1491067 <-- 1493787					
5	813577..814436	859	orf19.6079		813556 <-- 814416		orf19.6680	FGR27	816610 --> 818973	
5	820719..821260	541	orf19.6681		819927 --> 821171					
5	939333..939706	373	orf19.3904		937242 <-- 938012		orf19.3905		939322 --> 939903	
5	1003415..1004392	977	orf19.3945		1002133 --> 1003563		orf19.3946		1003703 <-- 1004587	
6	259305..260282	977	orf19.139	TRA1	254562 --> 266027					
6	650422..650621	199	orf19.5592		648633 --> 650654		orf19.5595	SHE3	652332 --> 653891	Tpk2 (Hyphe)
6	754701..756057	1356	orf19.5722		754024 <-- 755643	Tpk2 (Hyphe)	orf19.5723	POX1	756971 --> 758962	Tpk2 (Hyphe)
6	830450..831205	755	orf19.5758	SAL6	830292 --> 832007					
6	933024..933310	286	orf19.1078	HBR2	931212 <-- 932489		orf19.1080		934133 --> 935740	
7	19921..20195	274	orf19.7107		19888 <-- 20349		orf19.7106	VPS70	21072 --> 23375	Tpk1 (Hefe)
7	105074..105317	243	orf19.7056		103977 <-- 105816					
7	224232..224734	502					orf19.7006		223296 <-- 226653	Tpk2 (Hefe)
7	269904..270283	379					orf19.6913	GCN2	268109 <-- 273403	
7	352913..353665	752	orf19.6561	LAT1	352680 --> 354113		orf19.6559		354544 --> 356141	
7	615361..616563	1202					orf19.5177		614946 --> 616880	Tpk2 (Hyphe)
7	677937..678576	639	orf19.5143	TIM54	676831 --> 678033		orf19.5142	DFR1	678102 <-- 678680	
							orf19.5141		679378 --> 681549	
7	680488..680718	230	orf19.5141		679378 --> 681549		orf19.5140		682335 --> 684422	
7	879182..879461	279	orf19.7176	NPT1	878622 <-- 879887		orf19.7175	HLJ1	880388 --> 881383	

R	1120169..1120579	410	orf19.637	<i>SDH2</i>	1119650 <-- 1120441		orf19.555		1122196 --> 1123023	
R	1180084..1180443	359	orf19.5848		1179341 <-- 1181206					
R	1437167..1439047	1880					orf19.702		1436356 <-- 1439673	
R	1479572..1480040	468	orf19.1843	<i>ALG9</i>	1475586 <-- 1477277		orf19.1842		1479657 --> 1484333	
R	1749830..1750772	942					orf19.597		1749721 <-- 1751403	Tpk2 (Hefe)
R	1792929..1793537	608	orf19.6391		1792440 --> 1793360	Tpk2 (Hyphe)	orf19.6392		1793525 --> 1794562	Tpk2 (Hyphe)
R	1899514..1900192	678	orf19.7279		1899537 <-- 1900436					
R	1906483..1908100	1617	orf19.7283		1906456 <-- 1906824		orf19.7284	<i>ASR2</i>	1907189 <-- 1907965	
R	2131385..2131702	317	orf19.7570	<i>UGA3</i>	2129960 <-- 2132371					

Der Stamm AF1007, der HA-markiertes Bcy1 produziert sowie der Kontrollstamm CAF2-1 (WT) wurden unter Hefewachstumsbedingungen angezogen. Die Chromatinimmunpräzipitation erfolgte wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben. Die Chromatinfragmente wurden fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans* „Whole Genome Tiling Array“ kohybridisiert. Aufgelistet sind die Binderegionen des Proteins auf den Chromosomen 1-7 und R sowie die nächstpositionierten ORFs. Liegen Binderegionen innerhalb einer kodierenden Region, wurde dies durch eine lila Schrift gekennzeichnet. Eine Grüne Unterlegung zeigt, dass mehr als eine Binderegion in der Nähe des ORFs gelegen ist. Wurden ORFs ebenfalls unter anderen Bedingungen und/oder von anderen Proteinen gebunden, wurde dies ebenfalls notiert.

Tab. 9.4: Bindung von Tpk1 an chromosomale Sequenzen *C. albicans* 30 min nach Hyppheninduktion.

Chr	Binderegion	Größe (bp)	5'ORF	Genname	5'ORF Position	ebenfalls Binde-region von	3'ORF	Genname	3'ORF Position	ebenfalls Binde-region von
1	148004..148626	622	orf19.6028	<i>HGC1</i>	138579 <-- 140936	Tpk2 (Hyphe)	orf19.6027		150614 --> 151714	Tpk2 (Hyphe)
1	1516419..1516870	451	orf19.6195		1514154 <-- 1516388		orf19.6194		1516859 <-- 1517800	
1	1963556..1965312	1756	orf19.4757		1962576 --> 1964405		orf19.4758		1965089 --> 1965838	
1	2974775..2976176	1401					orf19.4991	<i>MPT5</i>	2976356 --> 2979172	Tpk2 (Hyphe)
2	180493..180715	222	orf19.2014	<i>BCY1</i>	178316 <-- 179692		orf19.2013	<i>KAR2</i>	180800 --> 182863	
2	236478..237078	600	orf19.1989	<i>DCW1</i>	235037 <-- 236395					
2	825528..827860	2332	orf19.829	<i>SCH9</i>	825527 <-- 827890					
2	979722..980366	644	orf19.147	<i>YAK1</i>	976903 <-- 979332		orf19.149		980006 --> 980443	
2	2012857..2014395	1538	orf19.1367.1		2012727 <-- 2012969		orf19.1367	<i>MTW1</i>	2013271 --> 2014215	
							orf19.1366		2014327 <-- 2015586	
2	2036377..2038342	1965	orf19.1357	<i>FCY21</i>	2034842 --> 2036386		orf19.1355		2038261 <-- 2039304	
			orf19.1356		2036830 --> 2037837					
3	289644..292294	2650	orf19.1717		288791 --> 290176		orf19.1715	<i>IRO1</i>	291579 <-- 293369	Tpk2 (Hyphe)
			orf19.1716	<i>URA3</i>	290331 <-- 291143					
3	369664..369949	285	orf19.1674	<i>CDC53</i>	367386 --> 369644		orf19.1673	<i>PPT1</i>	369944 <-- 371638	
3	478222..478413	191	orf19.1624		474903 <-- 477388		orf19.1623	<i>CAP1</i>	479014 --> 480513	
3	521166..522301	1141	orf19.1607	<i>ALR1</i>	517727 <-- 520510		orf19.1606		524219 --> 525844	
3	522574..523583	1009	orf19.1607	<i>ALR1</i>	517727 <-- 520510		orf19.1606		524219 --> 525844	
3	526384..529907	3523	orf19.227	<i>COX7</i>	526524 <-- 526853		orf19.230		529251 <-- 531893	
			orf19.229		527185 <-- 528435					
3	574391..574776	385					orf19.258		576625 --> 577383	
3	582787..583012	225	orf19.261		580882 <-- 582642		orf19.262	<i>SMC3</i>	583230 --> 586943	
3	634912..635748	836	orf19.290	<i>KRE5</i>	630514 <-- 634857		orf19.291		635043 <-- 635962	
3	794171..794799	628	orf19.6940		794013 --> 794453		orf19.6938	<i>MEU1</i>	794873 --> 795907	

3	881980..882850	870	orf19.5866		881429 <-- 881752		orf19.5867	<i>WSC1</i>	883131 --> 884207	
3	1205329..1206328	999					orf19.6980		1205809 --> 1207566	
3	1229104..1229453	349					orf19.6985	<i>TEA1</i>	1229452 --> 1232154	
4	445988..446283	295	orf19.4565	<i>BGL2</i>	444727 <-- 445653	Tpk2 (Hyphe)	orf19.4563		446380 <-- 447495	
4	523199..523935	736					orf19.2747	<i>RGT1</i>	523970 --> 527059	
4	834507..836541	2034	orf19.1596	<i>FGR28</i>	832750 --> 834546		orf19.1595		835182 --> 836888	
5	604057..604634	577	orf19.4284	<i>BUR2</i>	602769 --> 604349		orf19.4286		604784 --> 605758	
5	747505..747987	482	orf19.2650		745173 <-- 747470					
5	871195..872206	1011	orf19.3216		868715 --> 871219		orf19.3215		872183 --> 872572	
6	923525..923795	270	orf19.73		920465 --> 923449		orf19.1075		923865 <-- 924998	
6	947601..948466	865					orf19.1086		948405 --> 950273	
7	114102..115091	989	orf19.7054		114110 --> 114475		orf19.7053	<i>GAC1</i>	115894 --> 117909	
R	230941..231336	395	orf19.3254		228574 <-- 230394		orf19.3252	<i>DAL81</i>	231768 --> 234404	
R	352846..353729	883	orf19.2539		352941 <-- 353276		orf19.2540	<i>SAS3</i>	353353 --> 355770	
R	1067429..1067996	567	orf19.1805		1066201 --> 1067559		orf19.1806		1068806 --> 1069882	
R	1720896..1724778	3882					orf19.610	<i>EFG1</i>	1723589 --> 1725166	Tpk2 (Hefe)
R	2044648..2045909	1261	orf19.6601.1	<i>YKE2</i>	2043818 <-- 2044321		orf19.6601		2045083 <-- 2046291	Tpk2 (Hefe)
R	2066100..2066652	552					orf19.6591		2066600 --> 2067778	

Der Stamm AF1004, der HA-markiertes Tpk1 produziert sowie der Kontrollstamm II (*TPK1/tpk1*) wurden unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen. Die Chromatinimmunpräzipitation erfolgte wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben. Die Chromatinfragmente wurden fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans* „Whole Genome Tiling Array“ kohybridisiert. Aufgelistet sind die Binderegionen des Proteins auf den Chromosomen 1-7 und R sowie die nächstpositionierten ORFs. Liegen Binderegionen innerhalb einer kodierenden Region, wurde dies durch eine lila Schrift gekennzeichnet. Eine grüne Unterlegung zeigt, dass mehr als eine Binderegion in der Nähe des ORFs gelegen ist. Wurden ORFs ebenfalls unter anderen Bedingungen und/oder von anderen Proteinen gebunden, wurde dies ebenfalls notiert.

Tab. 9.5: Bindung von Tpk2 an chromosomale Sequenzen in *C. albicans* 30 min nach Hyppheninduktion.

Chr	Binderegion	Größe (bp)	5'ORF	Gencode	5'ORF Position	ebenfalls Binde-region von	3'ORF	Gencode	3'ORF Position	ebenfalls Binde-region von
1	36705..36908	203	orf19.6082		34525 <-- 35679		orf19.6081	<i>PHR2</i>	37852 --> 39486	
1	94440..94794	354	orf19.6048		93971 --> 94900		orf19.6047	<i>TUF1</i>	95215 --> 96495	
1	143170..143628	458	orf19.6028	<i>HGC1</i>	138579 <-- 140936	Tpk1 (Hyphe)	orf19.6027		150614 --> 151714	Tpk1 (Hyphe)
1	144696..145075	379	orf19.6028	<i>HGC1</i>	138579 <-- 140936	Tpk1 (Hyphe)	orf19.6027		150614 --> 151714	Tpk1 (Hyphe)
1	152149..154359	2210	orf19.6027		150614 --> 151714	Tpk1 (Hyphe)	orf19.6026	<i>ERG2</i>	154638 <-- 155291	
							orf19.6025		155448 --> 156329	
1	274451..275324	873	orf19.3328		272385 <-- 274208	Tpk2 (Hefe)	orf19.3329		275488 <-- 276963	
1	293700..294391	691					orf19.3336		296059 --> 296517	
1	440264..440810	546	orf19.3668	<i>HGT2</i>	434435 <-- 436072					
1	441603..442744	1141	orf19.3668	<i>HGT2</i>	434435 <-- 436072		orf19.3669	<i>SHA3</i>	442472 <-- 444259	Tpk2 (Hefe)
1	444782..446680	1898	orf19.3669	<i>SHA3</i>	442472 <-- 444259	Tpk2 (Hefe)				
1	448290..448719	429	orf19.3669	<i>SHA3</i>	442472 <-- 444259	Tpk2 (Hefe)				
1	468218..468605	387					orf19.3681		469144 --> 471771	Bcy1 (Hefe)
1	536089..536513	424	orf19.2942	<i>DIP5</i>	532457 <-- 534217		orf19.2943.5		536985 --> 537284	
1	649629..650205	576	orf19.3003		645168 --> 649614		orf19.3003.1	<i>RPL6</i>	650129 --> 651021	
1	709273..710361	1088					orf19.3038	<i>TPS2</i>	709532 --> 712198	
1	812051..812999	948	orf19.4457	<i>BNI4</i>	806539 <-- 811506					
1	933907..934401	494	orf19.6846		932824 <-- 933901		orf19.6847		934217 <-- 935776	
1	946178..946430	252	orf19.6852		943709 <-- 944536		orf19.6852.1		946320 --> 946508	
1	1081016..1082125*	1109					orf19.4056	<i>BRG1</i>	1082678 --> 1083949	
1	1085859..1088858	2999	orf19.450		1085006 <-- 1085239					
1	1165245..1166174	929	orf19.411		1163651 <-- 1164670		orf19.410.3		1166924 --> 1167627	
1	1324573..1325681	1108	orf19.1821		1324514 <-- 1324825		orf19.177		1337672 --> 1340068	
1	1411613..1411990	377	orf19.6252		1409842 <-- 1411044		orf19.6250		1411731 --> 1412774	

1	1475177..1475454	277	orf19.6219		1473564 <-- 1474919		orf19.6217	PGA63	1475717 --> 1479514	Tpk2 (Hefe)
1	1500538..1500844	306	orf19.6202	RBT4	1497979 <-- 1499055					
1	1512441..1513395	954	orf19.6197	DHH1	1509973 <-- 1511622		orf19.6196		1513343 --> 1513909	
1	1539179..1539618	439	orf19.4450	ZCF23	1536764 <-- 1538464	Bcy1 (Hefe)	orf19.4449		1540755 --> 1541501	Bcy1 (Hefe)
1	1540867..1541592	725	orf19.4449		1540755 --> 1541501	Bcy1 (Hefe)	orf19.4448	SOG2	1542293 --> 1544758	
1	1851385..1851766	381	orf19.386	SAM4	1850470 <-- 1851405		orf19.387	GCR3	1851872 --> 1854532	
1	2169343..2169569	226	orf19.4857		2167701 <-- 2168519		orf19.4858	VPS41	2169829 --> 2172714	
1	2307472..2307544	72	orf19.4912		2305295 <-- 2307229		orf19.984	PHO8	2309139 --> 2310647	
1	2405317..2406528	1211	orf19.2331	ADA2	2404448 <-- 2405785		orf19.2329.1	RPS17B	2406592 --> 2407384	
1	2531186..2531688	502	orf19.1169		2529627 <-- 2530577		orf19.1168	ZCF3	2531361 <-- 2531948	
1	2573862..2574284	422					orf19.1142		2574824 --> 2576743	
1	2591370..2593166	1796					orf19.5282		2593345 --> 2594787	
1	2728423..2728950	527					orf19.3765	RAX2	2729519 --> 2733700	
1	2850718..2851222	504					orf19.4936		2853604 --> 2853999	
1	2871139..2871626	487	orf19.4941	TYE7	2869020 <-- 2869829		orf19.4942		2871337 --> 2871705	
1	2911170..2911411	241	orf19.4960		2907412 <-- 2908446		orf19.4961	STP2	2911732 --> 2913486	
1	2943847..2945010*	1163	orf19.4972		2935625 <-- 2937571		orf19.4975	HYR1	2944794 --> 2947553	
1	2973825..2974218	393					orf19.4991	MPT5	2976356 --> 2979172	Tpk1 (Hyphe)
1	2989526..2989604	78	orf19.4997	KIS2	2987795 <-- 2990032					
1	2990901..2991302	401	orf19.4997	KIS2	2987795 <-- 2990032		orf19.4998	ROB1	2993348 --> 2996389	
1	3009313..3010835	1522	orf19.5006	GCV3	3008491 <-- 3009024		orf19.5007	ACT1	3011464 --> 3013252	
			orf19.5006.1		3009603 <-- 3010010					
1	3024436..3026249	1813	orf19.5014		3009603 <-- 3010010		orf19.5015	MYO2	3026140 --> 3030825	
1	3073208..3073505	297					orf19.5032	SIM1	3074225 --> 3075343	
1	3119227..3120423	1196	orf19.7221	SET3	3115551 <-- 3118760	Tpk2 (Hefe)	orf19.7222	PAM16	3119961 <-- 3120326	Tpk2 (Hefe)
1	3131741..3132276	535	orf19.7229	IML2	3128865 <-- 3131465					
1	3161154..3161574	420	orf19.7247	RIM101	3158672 <-- 3160657		orf19.7250		3162285 --> 3162728	

1	3174820..3176570	1750	orf19.7264		3174695 --> 3175633	Tpk1 (Hefe) Tpk2 (Hefe) Bcy1 (Hefe)	orf19.7265		3175688 --> 3176416	Tpk2 (Hefe)
							orf19.7266		3176818 --> 3176818	Tpk2 (Hefe)
1	3177347..3178542	866	orf19.7267	<i>SAM35</i>	3176785 <-- 3177540	Tpk2 (Hefe)	orf19.7270		3179728 --> 3180789	
			orf19.7269		3177598 <-- 3178260	Tpk2 (Hefe)				
1	3180466..3180776	310	orf19.7270		3179728 --> 3180789		orf19.7271		3181309 --> 3181629	
2	162817..164641	1824	orf19.2024		163117 --> 163476		orf19.2023	<i>HGT7</i>	164467 --> 166107	
2	169164..170398	1234					orf19.2020	<i>HGT6</i>	170217 --> 171869	
2	200560..200950	390	orf19.2005	<i>REG1</i>	195380 <-- 198415					
2	222094..222783	689	orf19.1995		219320 <-- 221449		orf19.1994		223605 --> 225650	
2	288089..289853	1764	orf19.1470		287869 <-- 288228		orf19.1471		289905 --> 290378	
2	315550..316991	1441	orf19.1486		314676 <-- 315173					
2	324947..325370	423	orf19.1488		322609 <-- 323268		orf19.1490	<i>MSB2</i>	327699 --> 331928	Tpk2 (Hefe)
2	377038..377352	314	orf19.1510	<i>SRD1</i>	374579 <-- 376459					
2	593510..593703	193	orf19.5806	<i>ALD5</i>	591488 <-- 592987					
2	602392..603283	891					orf19.5802		602098 <-- 603138	
2	660479..661860	1381	orf19.909	<i>STP4</i>	658991 <-- 660121					
2	675626..675871	245					orf19.903	<i>GPM1</i>	675910 --> 676656	
2	737307..738086	799	orf19.871		728433 --> 731492		orf19.868	<i>ADAEC</i>	740829 <-- 742566	
2	804974..805251	277	orf19.840	<i>RPL21A</i>	804502 <-- 805314					
2	807045..807518	473	orf19.838.1	<i>RPS9B</i>	805800 <-- 806875		orf19.839		807148 --> 809031	
2	816187..816871	684	orf19.835		813549 <-- 815909		orf19.834		816340 <-- 818868	
2	962286..962657	371	orf19.4490		961440 <-- 961997		orf19.4488		965502 --> 968417	
2	1015422..1015575	153	orf19.4127		1013161 <-- 1014567		orf19.4125		1015910 --> 1017148	
2	1025035..1025750	715	orf19.3521	<i>ARH2</i>	1023164 <-- 1023958		orf19.3522		1026295 --> 1026600	
2	1145523..1146808	1285					orf19.6874		1150098 --> 1151921	
2	1279396..1280050	654	orf19.5491.1	<i>ATP14</i>	1278751 <-- 1279452		orf19.5492		1279836 --> 1280288	
2	1308814..1309005	191	orf19.20	<i>RTS1</i>	1305671 <-- 1308223					

2	1311987..1312226	239	orf19.22		1310784 <-- 1311518		orf19.23	<i>RTA3</i>	1314829 --> 1316223	
2	1339747..1340279	532	orf19.34	<i>GIT1</i>	1334306 <-- 1335865		orf19.35		1341149 --> 1344079	
2	1606990..1607518	528					orf19.2192	<i>GDH2</i>	1608435 --> 1611605	
2	1617539..1617765	226	orf19.2187	<i>ALG7</i>	1615542 <-- 1617026		orf19.2186		1617552 --> 1618595	
2	1653037..1653530	493	orf19.2170	<i>PHM7</i>	1649472 <-- 1652255		orf19.2169		1654307 --> 1655002	
2	1783846..1784309	463	orf19.3599	<i>TIF4631</i>	1780055 <-- 1783309		orf19.3593		1784521 --> 1785726	
			orf19.3594		1783886 <-- 1784221					
2	1812578..1814239	1661	orf19.216.1		1812610 --> 1812792		orf19.216		1812963 <-- 1814489	
2	1890439..1893308	2869	orf19.4082	<i>DD48</i>	1889969 --> 1890607		orf19.4085		1892623 <-- 1893264	
			orf19.4084	<i>KIS1</i>	1891108 <-- 1892346	Tpk1 (Hefe)	orf19.4086		1893508 --> 1894158	
2	1963485..1964382	897	orf19.1395		1962161 <-- 1963177	Tpk2 (Hefe)				
2	2047918..2048225	307	orf19.1783	<i>YOR1</i>	2042944 <-- 2047410					
2	2098728..2099323	595	orf19.1760	<i>RAS1</i>	2096718 <-- 2097593		orf19.1759	<i>PHO23</i>	2099138 <-- 2100586	
2	2185554..2186125	571	orf19.5337	<i>UBC15</i>	2185048 --> 2185575		orf19.5338	<i>GAL4</i>	2186699 --> 2187484	
3	19719..19992	273	orf19.5463	<i>SEC6</i>	17074 <-- 19533	Tpk2 (Hefe)	orf19.5461		20107 --> 20643	Tpk2 (Hefe)
			orf19.5462		19605 --> 20204	Tpk2 (Hefe)	orf19.5459		19602 <-- 21179	Tpk2 (Hefe)
3	34014..34778	764	orf19.5443	<i>BNA4</i>	33094 <-- 34464		orf19.5442		34558 <-- 36054	
3	106293..106765	472					orf19.5392	<i>NGT1</i>	107368 --> 108897	
3	127615..128404	789					orf19.5383	<i>PMA1</i>	133120 --> 135807	
3	131501..132536	1035					orf19.5383	<i>PMA1</i>	133120 --> 135807	
3	136716..136984	268					orf19.5381		137632 --> 139983	
							orf19.5382		138356 --> 138817	
3	292981..293733	752	orf19.1715	<i>IRO1</i>	291579 <-- 293369	Tpk1 (Hyphe)				
3	339429..341009	1580	orf19.1690	<i>TOS1</i>	336918 <-- 338324		orf19.1687		342684 --> 344987	
3	347649..347845	196					orf19.1685	<i>ZCF7</i>	347788 --> 349137	
3	353519..353784	265					orf19.1682		353614 --> 354774	
3	455610..456942	1332	orf19.1637		454104 <-- 455045		orf19.1636	<i>STE50</i>	456166 --> 457548	
3	588623..588938	315	orf19.263.1		588472 --> 589302					
3	796645..797429	784					orf19.6937	<i>PTR2</i>	797828 --> 799558	

3	807691..808351	660	orf19.6930		806308 <-- 807024		orf19.6929		807891 --> 808418	
3	818986..819808	822	orf19.6924	<i>HTA1</i>	818897 --> 819295		orf19.6923		819833 --> 820864	
			orf19.6923.1		819560 --> 819775					
3	847070..848161	1091	orf19.2803		846304 <-- 847275					
3	1045119..1045613	494	orf19.5954		1044704 --> 1045305		orf19.5956	<i>PIN3</i>	1045672 --> 1046529	
3	1065544..1065858	314					orf19.5964	<i>ARF2</i>	1066235 --> 1066780	
3	1220869..1222465	1596	orf19.6983		1216188 <-- 1217360		orf19.6984		1226768 --> 1229056	
3	1358270..1358836	566	orf19.7380		1349946 --> 1352462	Tpk2 (Hefe)	orf19.7381	<i>AHR1</i>	1362620 --> 1364494	
3	1461130..1461877	747	orf19.7427		1460760 <-- 1461974		orf19.7428	<i>APN1</i>	1462394 --> 1463578	
3	1471538..1473154	1616					orf19.7436	<i>AAF1</i>	1477306 --> 1479144	
3	1583351..1584001	650	orf19.6810		1580930 <-- 1582861		orf19.6809		1584183 --> 1585151	
3	1606676..1607033	357					orf19.6798	<i>SSN6</i>	1608040 --> 1611282	
3	1757610..1757815	205	orf19.6716	<i>ABD1</i>	1755845 --> 1757269		orf19.6715		1757968 <-- 1758276	
3	1792187..1793004	817	orf19.6191	<i>TLO8</i>	1787713 --> 1788222	Tpk2 (Hefe)				
4	58679..58950	271					orf19.5665		58588 --> 59571	
4	100439..100793	354	orf19.4186	<i>PCT1</i>	99131 <-- 100504		orf19.4185		100986 --> 101441	
4	129887..130744	857	orf19.4167		126574 <-- 127113		orf19.4166	<i>ZCF21</i>	131943 --> 133832	
4	249597..250790	1193	orf19.4666		248828 <-- 249238		orf19.4664	<i>NAT4</i>	250950 --> 251564	
			orf19.4665		250043 <-- 250645					
4	318339..319413	1074	orf19.4631	<i>ERG251</i>	317232 <-- 318197					
4	382067..382415	348					orf19.4597		382277 --> 383152	
4	400425..401365	940					orf19.4590	<i>RFX2</i>	405150 --> 408485	
4	445988..446236	248	orf19.4565	<i>BGL2</i>	444727 <-- 445653	Tpk1 (Hyphe)	orf19.4563		446380 <-- 447495	Tpk1 (Hyphe)
4	449353..450059	706	orf19.4560	<i>BFR1</i>	447852 <-- 449240		orf19.2775	<i>IDI1</i>	450184 --> 451038	
4	477480..478647	1167	orf19.2767	<i>PGA59</i>	471123 <-- 471464	Tpk2 (Hefe)	orf19.2766		479521 --> 479829	Tpk2 (Hefe)
4	531902..533281	1379	orf19.2743		531821 <-- 533641		orf19.2742		534009 --> 534347	
4	533749..534186	437	orf19.2743		531821 <-- 533641		orf19.2742		534009 --> 534347	
4	560648..560876	228	orf19.2726		558959 <-- 559897					
4	569336..569906	570	orf19.2725		566926 <-- 567228		orf19.2724		571922 --> 573418	

4	575102..575826	724					orf19.2723	HIT1	577406 --> 577852	
4	628056..628240	184					orf19.2690		627864 --> 630557	Tpk2 (Hefe) Bcy1 (Hefe)
4	729547..730003	456	orf19.3374	ECE1	726613 <-- 727428					
4	750018..750217	199	orf19.1327	RBT1	745268 <-- 747433		orf19.1326		750848 --> 752818	
4	760306..761471	1165	orf19.1323		758543 --> 760858		orf19.1321	HWP1	762939 --> 764843	
4	770395..770608	213	orf19.1317	OSH3	766952 <-- 769486		orf19.1314		770678 <-- 772087	
4	886918..887415	497	orf19.5294	PDB1	885562 <-- 886701		orf19.5293		888375 --> 889898	
4	935826..936790	964	orf19.1409.2		935121 <-- 935405		orf19.1409.1		936933 --> 937879	
4	940846..941595	749	orf19.1409.3		940387 <-- 940662					
4	973311..973583	272	orf19.3828		973277 <-- 973609					
4	974554..975251	697	orf19.3827		974569 <-- 975579					
4	977529..978474	945	orf19.3826		976601 <-- 977449		orf19.3825	RCE1	979399 --> 980244	
4	979438..979721	283					orf19.3825	RCE1	979399 --> 980244	
4	1101539..1101810	271	orf19.740	HAP41	1097336 <-- 1099281					
4	1307325..1307926	601	orf19.1277		1305276 <-- 1306454					
4	1425384..1426348	964					orf19.2892		1426618 --> 1429254	
4	1504571..1504880	309	orf19.3134		1502722 <-- 1503162		orf19.3133	GUT2	1507275 --> 1509227	
4	1575585..1575933	348	orf19.3097	PDA1	1574337 <-- 1575542		orf19.3093	MSH2	1575765 <-- 1578386	
4	1596206..1597692	1486	orf19.3077	VID21	1594501 <-- 1596561	Tpk2 (Hefe)	orf19.3074	TLO10	1597337 <-- 1597996	
			orf19.3076		1596736 --> 1597134	Tpk2 (Hefe)				
5	306..1474	1168					orf19.5700	TLO11	1918 --> 2427	
5	136077..136557	480	orf19.930	PET9	134740 --> 135645	Tpk2 (Hefe)	orf19.929		137597 <-- 138904	Tpk2 (Hefe)
5	247997..248322	325	orf19.1960	CLN3	244214 <-- 245611		orf19.1959		253350 --> 254321	
5	250712..252478	1766	orf19.1960	CLN3	244214 <-- 245611		orf19.1959		253350 --> 254321	
5	276292..277575	1283	orf19.1946		274481 <-- 275380		orf19.1945	AUR1	277008 --> 278423	
5	290448..291092	644	orf19.1941	NUF2	288720 <-- 290129		orf19.1940		290443 <-- 291183	
5	336269..337802	1533	orf19.4145	ZCF20	333155 <-- 336412		orf19.4146	SMD3	338300 --> 338620	
5	351655..352110	455	orf19.4152	CEF3	347919 <-- 351071		orf19.4153		353433 --> 355034	

5	404185..404438	253	orf19.3195	HIP1	402835 <-- 404634		orf19.3193	FCR3	407977 --> 409176	
5	406405..406672	267	orf19.3195	HIP1	402835 <-- 404634		orf19.3193	FCR3	407977 --> 409176	
5	580225..580660	435	orf19.4273		576587 <-- 579346		orf19.4274	PUT1	580957 --> 582426	
5	773790..773969	179	orf19.2638		772041 --> 772868		orf19.2637		777343 <-- 778356	
5	781993..782387	394	orf19.6656	DUR3	780689 <-- 782254					
5	784395..784791	396	orf19.6658		782738 <-- 784369		orf19.6659		785599 --> 787305	
5	852238..852545	307	orf19.1106		848594 <-- 850948					
5	854240..855376	1136	orf19.1106		848594 <-- 850948		orf19.1105.3		855473 <-- 855730	
5	862998..863421	423	orf19.3219		859577 <-- 861382	Tpk2 (Hefe)	orf19.3218		863725 <-- 865191	
5	896569..896877	308	orf19.1286		896484 <-- 896840					
5	912325..913276	951	orf19.1280	SUI1	912081 <-- 912410		orf19.1279	CDS1	913853 --> 915208	
5	983077..983659	582	orf19.3934	CAR1	981892 <-- 982845		orf19.3936		984182 --> 987670	
			orf19.3935		983153 --> 983455					
5	992771..992973	202	orf19.3940.1	CUP1	992430 <-- 992531					
5	998235..998469	234	orf19.3942.1	RPL43A	997147 <-- 997796		orf19.3944	GRR1	998281 <-- 1999623	
5	1047235..1047684	449					orf19.3968		1051721 --> 1052032	
6	16469..16691	222	orf19.6323	HPA2	16135 <-- 16593		orf19.6322	ARD	17289 --> 18134	
6	195105..195754	649	orf19.100		194298 <-- 195350		orf19.101	RIM9	195973 --> 197013	
6	200212..200987	775					orf19.105	HAL22	200573 --> 201649	
6	208813..209317	504	orf19.111	CAN2	206049 <-- 207775		orf19.113	CIP1	209464 <-- 210363	
6	216474..217820	1346					orf19.118	FAD2	218253 --> 219563	
6	361075..361267	192	orf19.3415	PTK2	358174 <-- 360612					
6	365768..366814	1046	orf19.3414	SUR7	364264 <-- 365076		orf19.3412	ATG15	366504 <-- 368297	
			orf19.3413	FGR37	366036 --> 366344					
6	403518..403811	293	orf19.687.1	RPL25	402823 <-- 403696					
6	650940..651770	830					orf19.5595	SHE3	652332 --> 653891	Bcy1 (Hefe)
6	672964..673280	316	orf19.5606		672990 <-- 673310		orf19.5607		674328 --> 675269	
6	707879..708141	262	orf19.5625		705142 <-- 705675		orf19.5626		710237 --> 711466	
6	756418..756657	239	orf19.5722		754024 <-- 755643	Bcy1 (Hefe)	orf19.5723	POX1	756971 --> 758962	Bcy1 (Hefe)

6	839879..840719	840	orf19.5760	<i>IHD1</i>	838462 <-- 839640	Tpk2 (Hefe)				
6	1015170..1015583	413	orf19.2149		1013475 <-- 1015748		orf19.2150		1015905 --> 1016894	Tpk2 (Hefe)
7	51657..52605	948	orf19.7089	<i>PMR1</i>	48461 <-- 51214		orf19.7088		51707 <-- 52855	
7	369704..370249	545	orf19.6555		369532 --> 369888		orf19.6554		370382 --> 371209	
7	385091..385625	534	orf19.6541	<i>RPL5</i>	384489 <-- 385385					
7	410183..410795	612	orf19.6530		408388 <-- 409251		orf19.6529	<i>CDC34</i>	411055 --> 411789	
7	444107..446142	2035	orf19.6515	<i>HSP90</i>	439531 --> 441654		orf19.6514	<i>CUP9</i>	449876 <-- 450910	
7	447962..448240	278	orf19.6515	<i>HSP90</i>	439531 --> 441654		orf19.6514	<i>CUP9</i>	449876 <-- 450910	
7	613915..614566	651	orf19.5178	<i>ERG5</i>	612167 <-- 613720		orf19.5177		614946 --> 616880	Bcy1 (Hefe)
7	628556..628781	225	orf19.5171	<i>PMT1</i>	624686 <-- 627319		orf19.5170	<i>ENA21</i>	629811 --> 632726	
7	660976..661253	277					orf19.5155	<i>CHS6</i>	660140 <-- 662425	
7	752983..754029	1046	orf19.1334		749305 <-- 751269		orf19.1333	<i>SNG3</i>	753848 <-- 755677	
7	861682..861878	196	orf19.7188	<i>RPP1B</i>	861443 <-- 861769	Tpk2 (Hefe)				
R	27283..28223	940	orf19.7529	<i>EPL1</i>	25279 <-- 27540		orf19.7527		28507 --> 30687	
R	62750..63139	389	orf19.7509.1	<i>ATP17</i>	62794 <-- 63164		orf19.7510	<i>KIN2</i>	63737 --> 67375	
R	206791..207618	827					orf19.3264	<i>CCE1</i>	207731 --> 208729	
R	338649..339085	436	orf19.2529.1		338130 <-- 338318					
R	643693..644610	917					orf19.2841	<i>PGM2</i>	644428 --> 646110	
R	875325..875886	561					orf19.467	<i>WOR3</i>	878587 --> 880515	
R	926201..926840	639	orf19.496		923600 <-- 926371		orf19.497	<i>EAF7</i>	926647 <-- 927984	
R	1094881..1095167	286					orf19.646	<i>GLN1</i>	1095525 --> 1096646	
R	1188915..1189354	439	orf19.5845	<i>RNR3</i>	1187217 <-- 1189667					
R	1271612..1272002	390	orf19.454	<i>SFL1</i>	1255743 <-- 1258160	Tpk2 (Hefe)	orf19.451	<i>SOK1</i>	1274197 --> 1276674	
R	1527473..1527721	248	orf19.2356	<i>CRZ2</i>	1523701 <-- 1525254					
R	1608769..1609513	744	orf19.6127	<i>LPD1</i>	1606104 <-- 1607579	Tpk1 (Hefe)	orf19.6126	<i>KGD2</i>	1609238 --> 1610563	
R	1658969..1660465	1496	orf19.6286		1658591 <-- 1659187		orf19.6285	<i>GLC7</i>	1660910 --> 1661902	
R	1704078..1704322	244	orf19.3713		1703561 <-- 1704151		orf19.3714		1706954 --> 1708801	
R	1759101..1759653	552	orf19.589	<i>VPS21</i>	1758434 <-- 1759084		orf19.6365	<i>PTP1</i>	1760180 --> 1761298	
R	1792857..1793099	242	orf19.6391		1792440 --> 1793360	Bcy1 (Hefe)	orf19.6392		1793525 --> 1794562	Bcy1 (Hefe)

R	1805230..1805430	200					orf19.6402	CYS3	1805750 --> 1806949	
R	1828184..1828424	240					orf19.6416		1828758 --> 1830155	
R	1923863..1924200	337	orf19.7296		1922208 <-- 1923260					
R	2168894..2169575	681					orf19.7592	FAA4	2172618 --> 2174708	
R	2226234..2227604	1370	orf19.7622	SPT3	2225714 <-- 2267000		orf19.7624		2227458 <-- 2229053	
R	2229672..2229971	299	orf19.7625	PGA1	2229458 --> 2229856		orf19.7626	EIF4E	2230355 --> 2230984	
R	2280981..2282184	1203	orf19.7670		2278617 <-- 2281388	Tpk2 (Hefe)	orf19.7672		2281481 <-- 2282476	Tpk2 (Hefe)

Der Stamm AF1005, der HA-markiertes Tpk2 produziert sowie der Kontrollstamm TPK7 (*TPK2/tpk2*) wurden unter Hypheninduktionsbedingungen angezogen. Die Chromatinimmunpräzipitation erfolgte wie in 2.7.5 beschrieben. Die Chromatinfragmente wurden fluoreszenzmarkiert und auf einem *C. albicans* „Whole Genome Tiling Array“ kohybridisiert. Aufgelistet sind die Binderegionen des Proteins auf den Chromosomen 1-7 und R sowie die nächstpositionierten ORFs. Liegen Binderegionen innerhalb einer kodierenden Region, wurde dies durch eine lila Schrift gekennzeichnet. Eine Grüne Unterlegung zeigt, dass mehr als eine Binderegion in der Nähe des ORFs gelegen ist. Wurden ORFs ebenfalls unter anderen Bedingungen und/oder von anderen Proteinen gebunden, wurde dies ebenfalls notiert. Bei der mit *-markierten Binderegionen waren die roten Signifikanz-Peaks nicht überlappend.

9.1 Nukleotidsequenzen der Bankplasmide

1.

TTTTAAAGATAACCTACATGGATGATGTAATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGA
TCGAATCCCGGGGATCCATCGATTCTTCAAGCGGTCTTCTCTGTTCTCTAAATGATCCATGTTTTATAGCAAACCAA
ATTTTTCTCTGTCTGTACATGAGTCATAAGTTCATATCTATAATAGTTTTCACTTGACCTCCAATGCAAAGCAAGCG
ATTAACGCTAATGCAGTCATCATCGACACCAGTCCAGGGTATTCACTCAAACCTGTATCTTTTGAATAGATTTTGTTAT
TCTTTTCTCTTTTCTGTACATCTTCATTTGAATCTTGAACAATTTCAAATCTCTTCTAAATCTTTATCATCTTTACTCATGT
TGAAGTATATGGTGTAGGAATAATTAACAGTTATCTGAGAAAGAGAATTGGATTTTTCTTTTTCTTTCTTTTTGTTTCTC
CACGAACAAGAAATTTTTCAAACCTCAGAATCACTTTAGATTGACCTAAAAAACTGAGCTCTTTCGATGTCGACCTGCA
GAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCA
ATACATCGTTTTGCCTCTTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTT
TAAATGACTAGAATTAATGCCATCTTTTTTTGGACCTAAATCTTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAGAAGCTT
TGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCAGAAATTTACGAAAAGAT
GGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATT
AAATAAGTTATAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTAAAGTGACTCTTAGGTTTAAAACGAAAATTTCTTATTCTTGAGTA
ACTCTTCTGTAGGTCAGGTTGCTTCTCAGGGATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACACACCCTTACCGGCATGCCGGT
CGAAATCCCCTACCTTAGGACATATCCATTTTGAATTCGGGGCCGTTCCATAAAGAATTCATTTAAAGTTTAGTGCC
AAATCTAAAAAAGAACTTTTAAAGCAAGGATTTCTAATTTTTGGGGAAGGATCCCGCATCTGGGGGACTGTGGG
AACCTAAATCCCAGTTCTGAAACCGTCCCAAACCTTTATCGGCTTTAAAGGGCTACCCTCTCGGGAGATAAAAAAAT
TACATTCTTCCGAAAAAAATGGGGAATGGGTAACCTTC

2.

TTTTTTCGGATAACCCATGGATGATGTAATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAACAGTTATC
GAATCCCGGGGATCCATCGATTCTTCAAGCGGTCTTCTCTGTTCTCTAAATGATCCATGTTTTATAGCAAACCAAAT
TTTTCTCTGTCTGTACATGAGTCATAAGTTCATATCTATAATAGTTTTCACTTGACCTCCAATGCAAAGCAAGCGAT
TAACTCGTCTAATGCAGTCATCATCGACACCAGTCCAGGGTATTCACTCAAACCTGTATCTTTTGAATAGATTTTGTTATT
CTTTCTCTTTTCTGTACATCTTCATTTGAATCTTGAACAATTTCAAATCTCTTCTAAATCTTTATCATCTTTACTCATGTTG
AAGTATATGGTGTAGGAATAATTAACAGTTATCTGAGAAAGAGAATTGGATTTTTCTTTTTCTTTCTTTTTGTTTCTCCA
CGAACAAAGAAATTTTTCAAACCTCAGAATCACTTTAGATTGACCTAAAAAACTGAGCTCTTTCGATGTCGACCTGCAGA
GATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCA
ACATCGTTTTGCCTCTTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTA
AATGACTAGAATTAATGCCATCTTTTTTTTTGGACCTAAATTTCTTTCATGAAAATATATTACGAGGGGCTTATTCAGAAATC
TTTGGAACTTCTTTCGACAAGGTTAGGTCAAATCCTCAATCACAGGTTGTCGGTTTGTCTACCTTTGCCAAAAATTTTAC
GAAAACGATGGAAAAGGGTCCATCGATTGCGAACAAACGTTGGTGAACACTTCACAAATAAACCCAAACTTTTCGTA
CGGAATTTATAGATTATTTTCATCATT

3.

TAAACCGTATACACACATGGAGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGAT
CGAATCCCGGGGATCCATCGAACTCCTGATTAGTACGTGAATATGGTGTGCCACCGTATAGTACTGCAACACCGTC
TTGGTCACAGTATATGGCAATGTAACCAATTAAGAAAAAATCAATTGTAATCATGGTCCCATGCATAAGCAAGATAAAC
TTTTTTGACGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTGTTTTCTACACGACTACAACCTAAAACCTATTTGAGCTTTGTG
GCCGCTGGCTTTTTGAGATTACCTTAATGTCTCTCATCTCACCTTATTGCCAATGACAGTAAGGTTCTTTGCACCAGCC
AACGATCGACAACACCATCTTCTTTGACGTTTGGTCTTGTCTTTGGTTAAACGCTTTGGCTCTTTCTCTTGCTAGCA
CGTCTTAACCTCTGTTTATCTTACGACTCAACTCATCTTTGAGTACGACAAACCAGACTTTAATTGCACTTGCGACTGCC
CTTAACCTCATCACCTTAGCCTCATCATACCAATCTTATATCTCTGTGGTGCCAACTCGACTCGTTTCGACACATGCA
ATGGCTGCGCATCTTCCATGCTAATACTATCGGTAACCTAATATCAATGGTCTTGGCTTGGTGTGGTTGGGAATGAAATG
AGCTGAACACAACGCATCTAATTTATGTGTAACCTTGGTAAACAACCTACTAATCTCGTCGTGCTGTTTCTTACCTCTTCTG
TGATCGATTCTTGTGTGCATCAACATGGTTATACTCATCTCATACTCAGCTAACGACTTGGACGACTTTTGTTCAGAA
ACCTCGGCTCGTGGCGTCTTGTGGAACCTGGAAATGTCTGTTATTACGCTCTGGGCAAATCATTAAATCGTCTTCTTGA

AATGTGGGATCTTTGACACTTTGTTAACATAACCATTTTGATAGCTTCTGGACAGTGCGTTGGATGCACTCACAGGGACG
CCAAGTTTCATGTTAGCTGTTATTCGGGTTGCAAGCTGACTAGTGGCAGATCGTTTGCCTATTGGATTTTGAAATACTTCT
TTTTGGGACTTTCAAACATAAATCTCTTTAACTATTTGGCGAATTGCTAGATTCAATGCTGGATGAAAGTGACCTCCAATT
AATTTCTCCTAATTTGTTGATTCAACAAAAAAGATCTTCTTGTGGAACCGTTTCTATCATCATCATCAGTTTTGAGTTG
GTATCATTTTTGAGAAGAATCACGAGGGACTTATTGACAAAGAGAGGAGAAGATATTGAATCGAATCTACCCCGTGAAGA
AGCTGTTTTAAACATCTCATTTATTTAGTATCTTACGATAGATAAAATAAAACGGTGGGCCAATCGAAACTTGTACGGGTTCC
TAATAGAACCATATGGCTTGTAAATCTGAGACTGGGAGTCTAATTCATAAATGGGAATTTATCGTTAGGGCATTAAAAGA
ATTGTGGAACCTTACATATCGAGACTAGGGATTACGAGACGTAAAAGAGATGTGGAGACAATGGAATACTGAATTTCCACC
GCTTAAGAAAACTTTGTAGAGGGGAAGTAAGAACAAAATTGTAGGCATATAGAATTGATATAAGTTCGCGATAGGGATA
CGTGTTCGTATCTGGATATGCCTGTTTGGGCTAACTGAGTGAACATCAGTAAAGTCCAAAGCTATGAGATAAAAAATCCCC
GTTTCGTAAGCCACGCGTGGAGGTGGCTGTGATCGATGGAATCTCATAGAATAGATGGACTAG

7.

TTTAAGGGATAACCACATGGATGATGTATATAACTATCTATTGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAAGAGAT
CGAATCCCAGGGGATCCATCGCTCGGAGTACTATATGCGAAAGCAGAAAAGACAATTGCAAGAATACAGAGAGTTCTTC
TCTGGGCTATTGCAATGTGTTAAGGCCAAGTCGACGAGTGGGGAGAGTCTGGAAGTGATATACACATCACGACCTACTT
TATACGCTACGTTCCGGCATGGGCGAGCCACTTTGCGGTGGCAAGCCTGAACAGTCCCACACCAGATATCTAACGATTCTGT
GTATGGGCACTGATGGATTTAGTGGATTACTAGCTGATAGCAAGTATTGAAAACCTAAAACCGACTCGGGGGTATGCCTTG
GCAAGTAGCCGGAGTAAAATCTGTGACTTTGCTGAGTGAACCTCCCTCCATGGTTGGCGATGTTGACGTGCGCGGCAGTT
CTTGTCGTATCACAGTCGCACGGACACCACCCGGGAGAATCTTAAGAGGGCTATATGGATGTGGAACGGTTTGCTTGCT
GTGGTAAAACACTGGCGGGCGAGCCGACGTTCCACGGACACAGCAATGTGTTGCAACCAAATAAATAACTTGTACGGTT
TGAACGTGTTTTGGCTGCTCCTCCAGTTCTTGGCGGGAGAAGCTTGGGCGACAAAATCTCAATTGGTCATTTATTAGGT
GCCGCGGGTGCCGTTGAATCAATTTTACATTAATGCCATCAAAACAGGTCAAATACCAGCAACTTTAAATCTCGATGTC
GACCTGCAGAGATCTATGAATCGGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAAT
TTTTTTTCAATTTATACATCGTTTTTGCCTTTCTTTATGGTAACTATACTTCTCTAAATTTTCAATCTTGGGCCATGTAACCCT
CTCGATCTATAGAAATTTTTTAAATGGACTAAGAATTAATGGCCATCTTTTTTTTTGGGACCTAAATTTCTTCATGGAAAAT
ATAATTACGAAGGGCTTTATTACAGAAAGCTTTTGGACTTCTTTCGCAATACGTGTTGTGCAAAAGTCCCAATCCAAGGGT
TGTCTGGCTTGGCCTACCTTTGGCCGAAAATTTACGAAAAAGAATGGGAAAAAGGGGCTAAATTCGTTTGTGTAAGATA
CCGTTGGTTGGAACCTTCCCAAATAAACCAGAAATTTCTTATAGAATTTCTTGATTTTTTATTACATAACATACATTTTTTA
AAAATG

8.

TTTAACCGTGAACACTCATGGATGATGTATATAACTATCTATTGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAAGA
GATCGAATCCCAGGGGATCCATCGCTCGGAGTACTATATGCGAAAGCAGAAAAGACAATTGCAAGAATACAGAGAGTTC
TTCTCTGGGCTATTGCAATGTGTTAAGGCCAAGTCGACGAGTGGGGAGAGTCTGGAAGTGATATACACATCACGACCTA
CTTTATACGCTACGTTCCGGCATGGGCGAGCCACTTTGCGGTGGCAAGCCTGAACAGTCCCACACCAGATATCTAACGATTC
TGTGTATGGGCACTGATGGATTTAGTGGATTACTAGCTGATAGCAAGTATTGAAAACCTAAAACCGACTCGGGGGTATGCC
TTGGCAAGTAGCCGGAGTAAAATCTGTGACTTTGCTGAGTGAACCTCCCTCCATGGTTGGCGATGTTGACGTGCGCGGCA
GTTCTTGTGATCACAGTCGCACGGACACCACCCGGGAGAATCTTAAGAGGGCTATATGGATGTGGAACGGTTTGCTT
GCTGTGGTAAAACACTGGCGGGCGAGCCGACGTTCCACGGACACAGCAATGTGTTGCAACCAAATAAATAACTTGTACG
GTTTGAACGTGTTTTTGGCTGCTCCTTCCAGTTCTTGGCGGGAGAAGCTTGGGCGACAAAATCTCAATTGGTCATTTATTA
GGTGCCGCGGGTGCCGTTGAATCAATTTTACATTAATGCCATCAAAACAGGTCAAATACCAGCAACTTTAAATCTCGAT
GTCGACCTGCAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCA
ATTTCTTTCATTTATACATCGTTTTTGCCTTTCTTTATGTAACATACTTCTCTAAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATC
TATAGAATTTTTTAAATGACTAGAATTAATGCCATCTTTTTTTTTGGGACCTAAATTTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTT
ATTCAGAAAGCTTTGGACTTCTTCCCAGAGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCAGAAAT
TTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGCTGGTAAATACGTTGTTGACCTTCTAATTAACCGAAATCTTAAGATTAG
AATTTTATTATAAATAAGTTAAAAAAAATAAGTGGTAACAATTTTAAAGTGACCTTAGGTTTTAAACGAAAATCCTTATC
TTGAGAAACCTTCCCGAAGGACAGTTGCTTCTCAAGGATAACAGGAGGGCCCTTTATTGACCACCTCCACCGGGT
GGCCGGCGAAATCCACAACCAAGAAAATTACATTTGGGAATTCG

9.

NNNGGGGTAACCTACATGGATGATGTATATACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGAT
CGAATCCCGGGGATCCATCGATTCTTCAAGCGGTCTTCTCCTGTTCTCTAAATGATCCATGTTTTATAGCAAACCAAAA
TTTTCTCTCTGTCTTGACATGAGTCATAAGTTCATATCTATAATAGTTTTCACTTGACCTCCAATGCAAAGCAAGCGA
TTAACTCGTCTAATGCAGTCATCATCGACACCAGTCCAGGGTATTCATTCAAACCTGTATCTTTTTGAATAGATTTTTGTTATT
TCTTTCTCTTTTTCTGTACATCTTCATTTGAATCTTGAAACAATTTCCAAATCTCTTAAATCTTTATCATCTTTACTCATGTT
GAAGTATATGGTGTAGGAATAATTAACAGTTATCTGAGAAAGAGAATTGGATTTTTCTTTTTCTTTCTTTNTGTTTCTCC
ACGAACAAGAAATTTTTCAAACTCAGAATCACTTTCAGATTGACCTAAAAAACTGAGCTCTTTCGATGTCGACCTGCAG
AGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGGGCATCGTGCACCATCTCANTTTTCTTTCATT
ATACATCGATTGTGCCTCTTTTATGTAECTANACTCCTCTAAGNTCAATCTTGGCCNTGTAACCTCCTGATCTANNGATNT
TTTTANAGTGACTAGNATTAATGNNCAACNTTTTTGGANCCNGAANNCCNNCATGNAANAGANNTTACCGAGGGCC
TTANTTCGGGANGCTTTGGGNANTTCTTCNGCCAGAGGGTNTGGNNCAANGTCGCCAANTNNNAGGGGTGTCNGNNTTG
GNCTACCTTGCCNGNAAGTTTTNCGAAAANNNGCGANANNNGGGGCGNCTNCGNGGGGGGNANACTTGNTNGAAG
CTNNCGNANNAGNCNNATTTTCTGNGG

10.

TCGGAGAACTACTCGCATGATGTATATACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAAT
TCCCGGGGATCCATCGAATTTATCACTTAAATCTTAACCAAATCATAATCTTGATCATAACCTAAATTTTCATCAAACAAA
TAATCTTCAACAATTGAGAAACGAATGGAATCACTTACAATTGCTTATATTGTAATATTATTATTGTTGTCATTATAATAA
ACATTTCTGTATGTTAGGGTGGCTAAATTGTATTGCCAACGACGAATACAAGGGAATAAATGGATCGTTAATCACCCCA
CTGAAAACAATTTTAAACATTATTTTCAATCAAATTATCCATTGCATTATTAAGTTGTATGGATAACTTACTTTTAGTATTTGA
TACTGGAATAGCTCATTAAATTTTCAATTTCAATTGGCGTGAATGCTCTTATGATTAATTTTGAGTTAATCCTTTAAAGGG
ACCTAAAAACCTCCATTCATACATAGCATCCCAAATACTTGTTTTCTGCTAGTAATCCCACTATCATGCTCAGTCAATAGTT
TTGACAATAAATTAATGGCAATAATTGAACCAATCCCATGACTGACAAAAATATAAACTGACTTGATTCTAGAGTTTGGAT
CCAATTTTTAGTGATCAATTGATACGATTTTTCAACTCGTTCATTCACTTTCCCTGTCCTTCCACTGATAGAGTTTCTATGTC
ATAATCATTCAAGTCGAATTCATTGTCAATTTTCTTTTAAACCATGATAAACTTGATTGAGTTTGTGTTTTCCACAAAATG
TAATTGGAAATACCCACTAAGATCGGATCCCCCAATCAAATGAAATCGTAACTAAATTTTATTTGGGGTAAAAAATGA
AATGGCACCTCCCAATTAATGGGGATAATCCTTTTTTTGAATCC

11.

TTTTCCATAGAAACAACCTCGGAGATGTATATACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATC
GAATCCCGGGGATCCATCGTAGGATGGCCAACCCACTCATTCAAAACCTCCCAACACATCTCGTCTCTACCTGAACAA
GGCATGTATGTTTCTGCTTTTGGCAATTGTCTGTATGAAGGACCATAGGCCTTACATAACGAAAGCTCAAGATGATGTTTT
TGAAAGTGATGTTTTCAATTTTTGAGGTTTATCCTCGTACCCAACAACATTTTAAACCAATTAATAACTCAACATTTGTG
TCTCCAATGAAACCTTGAACCTTTCAACTAAAGTATCTTTGTCAATGATATCTTGAGTGAATAAATCAACAATTTCAAAA
ATCGCGTATGTTTGTGTTACCAATGGCCTTCTTAACTTTATCAAAAAACCAATTTCTTCTGAAAAAGGAGTCTTTTAA
CCGTACTGTGAGGACTGTTTCTGGAACACCTGGCACTAATGTAGGGTTGGTTGTAACAGGTACAGGGACTTGTGCT
TTATTTGATACCTTTTGCCTCTTTGTGGTACTGCACCAGTCTCATGTTAGAGTACTGACTTTCTTGGTTGTAATATCTTGA
TAGGGTTGAGAAACAGACTTTTTCTTTCCCAACTTGTTCATTAGATGGAGCTCCATAACAGATTCGGGACTGGCTGCAC
CTTGAAATGTTTTGTTGTTGAGCAGCTGTCTGCTGTAATTGTGCATATTGTTGATTTGTGGCTTGTCCAGCAGGTTGGAA
ATTGCCAACAGGCGGCAACTGTGTTCCATTGTTAACATAATATCCATCCTGTGCTGGTGTCTGTTGGTAATTTAGATTGCTG
GTGTCTGGCAAAAACCTGTTTAAATCATCAAAAAGATCTGGGTGAGTTAGCAAAAATAATACAGTAACTTGTTTCATAAAC
TTTCAGCAAATTTGTTTTAG

12.

TTCCGGAGAACTACTCGGAGATGTATATACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCG
AATCCCGGGGATCCATCGTATTGACCAACCAAGAAGCTGAAATCCCCTTTGTAACCCAAAGAAGGGAGGTAATATGAT
GCTCCATTAACAAATTAATGATGCTCAATATTTACAGAAATCAAATTTGGTACACCGGGTCAACCTTTAAGGTTATCTT
GGATACTGGTTCCTCAAACCTTATGGGTTCTTCCCAAGATTGACTTCATTAGCGTGCTTTTTACATGCTAAATATGACCATG
ACGCATCCTCGACCTACAAAGTCAATGGTAGTGAATCTCAATTCATATGGTTCTGTTCTATGGAAGGTTACATATCCCA
AGACGTTTTGACTATTGGGGATTTGGTTATCTGGCCAAGATTTGCTGAAGCTACCTCCGAACCAGGTTTAGCATTGCGA

TTTGGTAAATTCGATGGTATTTTGGGTTTGGCTTATGATACTATTTTCAGTCAACCATATTGTTCCACCAATCTACAATGCCAT
TAACCAAGGCTTGTAGAAAAACACAGTTTGGTTTCTATTTGGGTAGTACCGACAAGGACGAAAACGATGGTGGGTTGG
CTACATTTGGTGGTTACGATGCCTCCTGTTTCCAAGGCAAGATCACTTGGTTGCCAATCAGAAGAAAAGGCTTACTGGGAAG
TTTTGTTTGAAGGTATTGGATTAGGCGATGAGTACGCTGAATTGCACAAAACAGGTGCTGCCATCGATACTGGTACTTCTCT
TGATTACATTGCCATCCTCATTGGCTGAAATTATCAATGCCAAAATCGGAGCAACCAAGTCATGGTCAGGTCAATACCAAG
TCGATTGTGCTAAAAGAGACTCTTTCCTGA

13.

GTTANCACTCATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATT
CCCGGGGATCCAAACCAATGTCACTGAGTCTTTGTCTGTTCAAAGCTCAACTGCTGAATCCGATACCGCTCCTTCATCAAT
CACATCGGCAAGTACCAAGAAAGCAAGAGTAAAAAGAACAATTACCAAAAAGGTTACTAGAACTATCAAAAAAGATGAAT
TGTA AAAAGTTGTATAGTTAGAATGCATAATTCATAAAGCTTTAGAATATTTTATCATAAATAATGTAGATATCATTGTCTCT
TGTATTTTTTGTGTGGTCAAACATATTTTGTACTATTAAGCTGAATCCAAAAACATGATATACTATGGAGAGTTATAGCAAT
TTTTATCAGTTCGAATTCTTATAGCGCTGTCGCTACCATCTGTCAATTCAAGCTTATTGATGCCTCATTCCATCAAGCATTGG
AACGCGCCTGAAAAA AAAAAACATTACTGAGAATATAGAAAGAGTCTATTCTTTTGAATATTTATCCAGTTGAAAACACT
ATTTCACTATACTATATGAACCTCAAAGATATTACCGATCCGTCGGATTTTAAAACCAAAAATTGCCTGCATTAGCAGAGC
TAGATATTTTAAAGAGGTGCTATATATGCAAAGATCTATTGAATGCACCCGTGAGGACACAATGTGATCACACGTAGGGG
ATCTTTGGTTTTGGTCTTATATCCGAAAAGTACTTTTAGGNAATGTGGTCCCNNTTGTGGGGATGGTNCNTTANTTAAAC
CCATTANANCTTTGGTTTGNCTTTCCNCGCCNGNGGNTTNAACTTGNTACTGGGANTNATGAANGTTGCCGTGNC
GGGTNTTGANGNGNCTGCCGNANTNANGNNGGACTCNCTNTNGGGNCCNNNNNCNNGGNGTCTNNTGNGNNG
TTCCTTCNNNTNGGCTTGGNGNNGGTTNTCNNGT

14.

TTTAAACGGATAACCACATGGATGATGTAATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATC
GAATCCCGGGGATCCATCGATTCTTCAAGCGGTCTTTCTCTGTTCTCTAAATGATCCATGTTTTATAGCAAACCAAAAT
TTTTCTCTGTCTTGTACATGAGTCATAAGTCCATATCTATAATAGTTTTTCACTTGACCTCCAATGCAAAGCAAGCGAT
TAACTCGTCTAATGCAGTCATCATCGACACCAGTCCAGGGTATTCACTTCAAACCTGTATCTTTTTGAATAGATTTTGTATTT
CTTTCTCTTTTCTGTACATCTTCAATTTGAATCTTGAAACAATTTCCAAATCTTCTAAATCTTTATCATCTTTACTCATGTTG
AAGTATATGGTGTAGGAATAATTAACAGTTATCTGAGAAAGAGAATTGGATTTTTCTTTTTTCTTCTTTTTGTTTCTCCA
CGAACAAAGAAATTTTCAAACCTCAGAATCACTTTAGATTGACCTAAAAAAACTGAGCTCTTTCGATGTCGACCTGCAGA
GATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTTAT
ACATCGTTTTGCCTCTTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTA
AATGACTAGAATTAATGCCATCTTTTTTTGGACCTAAATCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAGAAGCTTTG
GACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATG
GAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTA
AATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTAAAACGAAAATTTCTATTCTTGAATA
ACTCTTCTGTAGGTCAGGTTGCTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGCATGCCGGT
CGAAATCCCTACCTATGAACATATTCCATTTTGAAAATTCGGTGCCTTCTATTAAGG

15.

TTTTCCCGGATAACCTACATGGATGATGTAATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGA
TCGAATTCGCGGGGATCCATCGTGATAACGGCACTGTGATGACATCTGCATTGAGACAACCTCAAACCATACGCGCCCC
CCACCAAACCAACAAACAGCTTCAGGATTTTCTTTGATGACGAGATTGACTCTATAGACCAGTTAGAAAACGACAAACAA
AACGAGGGTAGTTCATCAGAAAGTGCTAAGCGAACTTCAAAGAAACGAAACAATCTGAATCTGAAAAATGACAATTTT
TGTTAATCCATTAATATAACCACAATATAAAGTAAAGAGTCTTAAATCATTAGCAGAAATCTGGAAGGAATACGCCCA
TGGGTTAAACAACAAGCCTCCTTTGAAATCTTTAGAAACCAAGTATGGAACCTAAATGGAGAAACGAAACAGAGTCGAGAA
CGATGTCGACCTGCAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCAT
CTCAATTTCTTTCATTTATACATCGTTTTGCCTTCTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCT
GATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAATTAATGCCATCTTTTTTTGGACCTAAATCTTTCATGAAAATATATTACGAGG
GCTTATTCAGAAGCTTTGGACTTCTCGCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTGGCTTGTCTACCTGCCAG

AAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGAT
TTATGATTTTTATTATTAATAAGTTATAAAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTAAACGAA
AATTCCTATTCTTGAGTAACTCTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACC
TCTACCGGCATGCCGGTCGAAATCCCCTACCCTATGAACATATTCCATTTTTGAATTTCCGGGCCCGTTCTATTATGAATTT
CATTATAAAGTTTATGTCAAATATCTAAAAAAGAAAATCTTTTAAAGCAAGGATTTCTTAACTTCTTCGGCAAAGCATCC
CCGACTTCGGGGGACTGTTGGAACCCCTTAATCCCCAGTTCTGAACCC

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. J. F. Ernst für die Vergabe des Themas sowie die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit danken. Vielen Dank für die Unterstützung und die motivierenden Worte - besonders in den letzten Monaten! Darüber hinaus bedanke ich mich dafür, dass ich die Möglichkeit hatte internationale Kongresse zu besuchen.

Herrn Prof. Walter Däubener danke ich herzlichst für die Übernahme des Koreferats und die Unterstützung als „second supervisor“.

Der Manhot Graduiertenschule „Moleküle der Infektion“ („MOI“) danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes sowie die zahlreichen Weiterbildungsmöglichkeiten.

Bei allen ehemaligen, vorübergehenden und jetzigen Mitgliedern der AG Ernst möchte ich mich nicht nur für die Hilfe und die Fachgespräche, sondern auch für die gemeinsamen Unternehmungen (Kirmes, Altstadt, Grillen, etc.) bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich dabei an unsere Anna richten! Nicht nur mit deiner Arbeit, sondern auch mit deinem sonstigen Einsatz hast du uns alle tagtäglich sehr unterstützt.

Bei meinem „MOI-Kollegen“ Lasse möchte ich mich für die ablenkenden Gespräche, den Schwimmbad Tipp und die unzähligen E-Mails mit Sequenzen bedanken!

Besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle auch an Marc richten. Was für ein Glück, dass wir fast gleichzeitig in der Arbeitsgruppe gelandet sind, denn ohne dich hätte es nicht so viel Spaß gemacht! Danke für die Gespräche, deine Unterstützung, deinen Einsatz (auch wenn wir uns immer beschwert haben: Organisieren und Verantwortung übernehmen macht Spaß!) und all die Kaffee-/Bier- und Meckerpausen (und auch die Pausen vom Meckern ;)).

Lieber Jan, danke für all die aufbauenden Worte, die oft nicht direkt etwas bewirkt haben aber immer hängen geblieben sind. Die Jahre waren wirklich anstrengend aber jetzt wirst du mehr von mir haben... wenn Emma es erlaubt! :)

Zuletzt möchte ich meiner Tochter Emma danken. Du wirst es noch nicht verstehen aber du warst/bist mein Glücksbringer. Bei den letzten Experimenten warst du dabei und alle haben geklappt - und das teilweise sogar auf Anhieb!

Erklärung

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

Düsseldorf, den 27.09.2013

(Alida Schäkel)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Stichernoth, C., **Fraund, A.**, Setiadi, E., Giasson, L., Vechiarelli, A. and Ernst, J.F. (2011) Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **10**: 502-511.

Schaekel, A., Desai, P.R., and Ernst, J.F. (2013) Morphogenesis-regulated localization of protein kinase A to genomic sites in *Candida albicans*. *BMC Genomics* **14**: 842.