

**Struktur-Funktionsanalyse des Transkriptionsfaktors**  
**Efg1p von *Candida albicans***

**INAUGURAL-DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
Christine Sachi Noffz  
aus Berlin

November 2006



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Candida albicans</i> – ein humanpathogener Pilz	1
1.2	Dimorphismus – ein wichtiger Virulenzfaktor	2
1.3	Regulation des Dimorphismus	3
1.4	Der Transkriptionsfaktor Efg1p	5
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Chemikalien und Enzyme	10
2.2	Stämme	10
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	10
2.2.2	Hefe Stämme	10
2.3	Medien	12
2.3.1	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	12
2.3.2	Medien zur Anzucht von Hefe-Stämmen	12
2.3.3	Hypheninduktion bei <i>C. albicans</i> auf festen Medien	12
2.3.4	Hypheninduktion bei <i>C. albicans</i> in flüssigem Medium	13
2.3.5	Induktion von Chlamydosporen in <i>C. albicans</i>	13
2.4	Plasmide	13
2.4.1	In dieser Arbeit verwendete Basisplasmide	13
2.4.2	In dieser Arbeit konstruierte Vektoren	13
2.5	Primer	14
2.6	Molekularbiologische Methoden	15
2.6.1	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	15
2.6.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	15
2.6.3	Konzentrationsbestimmung der DNA	15
2.6.4	Agarose Gelelektrophorese	15
2.6.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	16
2.6.6	5'-Dephosphorylierung linearisierter DNA	16
2.6.7	Ligation	16
2.6.8	Standard-PCR	16
2.6.9	Kolonie-PCR	16
2.6.10	Mutagenese-PCR	16
2.6.11	Transformation von <i>E. coli</i>	17
2.6.12	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	17
2.6.13	Transformation von <i>C. albicans</i>	17
2.6.14	Southernblot-Analyse	17
2.7	Biochemische Methoden	18
2.7.1	Herstellung von Rohextrakten aus Hefe	18
2.7.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	18
2.7.3	Herstellung von Rohextrakten aus <i>E. coli</i>	18
2.7.4	Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford	19
2.7.5	Dephosphorylierung	19
2.7.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.7.7	Immunoblot-Analyse	19
2.7.8	Silbernitrat-Färbung	20
2.7.9	Coomassie-Färbung	20
2.7.10	Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay“)	20
2.7.11	Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (lacZ-Assay)	21
2.7.12	Ammoniumsulfatfällung	21
2.7.13	Immunpräzipitation	21
2.7.14	Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose 4B	22

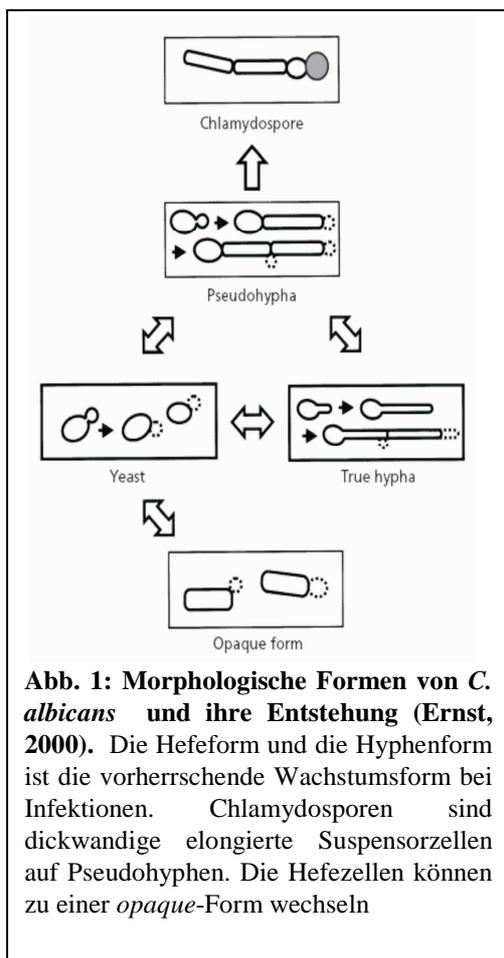
2.7.15	Affinitätschromatographie mit Anti-HA-Affinitäts-Matrix.....	22
2.7.16	Kationenaustauscher-Säule.....	22
2.7.17	Heparin-Säule.....	23
2.7.18	Affigel-Blue-Säule.....	23
2.7.19	Gelretardierungsexperimente.....	23
<b>2.8</b>	<b>2-D-Gelelektrophorese.....</b>	<b>24</b>
2.8.1	Probenvorbereitung.....	24
2.8.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	24
2.8.3	SDS-Gelelektrophorese.....	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktions-Analyse des Transkriptionsfaktors Efg1p.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Systematische Deletionen des Efg1p Proteins.....	26
3.1.2	Morphologie der Deletionsstämme.....	29
3.1.3	Einfluss der Deletionen auf die Hyphenbildung.....	30
3.1.4	Chlamydosporenbildung der Deletionsstämme.....	33
3.1.5	<i>EFG1</i> -Deletionen unter der Kontrolle des <i>PCK1p</i> -Promotor.....	34
3.1.6	Überexpression der <i>EFG1</i> -Deletionsvarianten.....	37
3.1.7	Untersuchung der <i>EFG1</i> -Deletionen auf ein dominantes Verhalten.....	39
3.1.8	<i>opaque</i> – <i>white</i> -Phänotypwechsel.....	39
<b>3.2</b>	<b>Repressor-Aktivität des Efg1p.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Repressor-Aktivität in Kinase-Mutanten.....	41
3.2.2	Repressor-Aktivität in <i>EFG1</i> -Deletionen.....	44
<b>3.3</b>	<b><i>In vitro</i> Untersuchungen zur Bindung von Efg1p an die E-Box 5'-CATATG-3'.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von Efg1p.....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Untersuchung der posttranslationalen Modifikation der <i>EFG1</i> -Deletionen.....	49
3.4.2	Phosphorylierung der <i>EFG1</i> -Deletionen.....	50
3.4.3	Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von Efg1p.....	52
<b>3.5</b>	<b>Vorversuche zur Isolierung von Efg1p und seinen Interaktionspartnern.....</b>	<b>53</b>
3.5.1	Isolierung von Efg1p über eine HA-Affinitätsmatrix.....	53
<b>3.6</b>	<b>Vorversuche zu Reinigungsmöglichkeiten für Efg1p.....</b>	<b>55</b>
3.6.2	2D-Gelelektrophorese.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>EFG1</i>-Deletionsvarianten.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Die APSES-Domäne – eine wichtige Sequenz für die DNA-Bindung.....</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Funktion der Glutamin-reichen-Domänen.....</b>	<b>71</b>
<b>4.4</b>	<b>Efg1p bindet an die E-Box 5'-CATATG-3' im eigenen Promotor.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5</b>	<b>Efg1p wirkt als Repressor.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6</b>	<b>Efg1p ist posttranslational modifiziert.....</b>	<b>74</b>
4.6.1	Phosphorylierung.....	74
4.6.2	Efg1p hat das elektrophoretische Laufverhalten eines 90 kDa-Proteins.....	76
<b>4.7</b>	<b>Vorversuche zur Isolierung von Efg1p.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Candida albicans* – ein humanpathogener Pilz

Pilze spielen eine wichtige Rolle im täglichen Leben des Menschen und werden zur Herstellung von Lebensmitteln wie Käse, Brot, Bier und Wein, aber auch in der Medizin zur Produktion von Antibiotika und Impfstoffen eingesetzt. Neben diesen apathogenen Pilzarten existieren aber auch humanpathogene Pilze, die das Leben des Menschen erschweren. Zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen gehören *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus*. In Deutschland werden 80 % aller schweren Mykosen durch *Candida*-Arten ausgelöst (Pfaller, 1996). *C. albicans* ist ein opportunistischer Erreger, der für gesunde Menschen ungefährlich ist. Bei etwa 30 % aller gesunden Menschen lässt sich dieser Pilz in den Schleimhäuten von Nase, Rachen, Genitalbereich und im Verdauungstrakt nachweisen (McCullough *et al.*, 1996; Sobel, 1997). Nur bei immundefekten Menschen löst *C. albicans* eine gefährliche systemische Candidose aus (Greenspan und Greenspan, 1996), die in 50 % aller Fälle tödlich verläuft (Wey *et al.*, 1988).

*C. albicans* gehört zu der artenreichen Klasse der Ascomycota (Schlauchpilze) und wird der Unterklasse *Saccharomycetidae*, der Ordnung *Saccharomycetales* und der Gattung *Candida* zugeordnet. *C. albicans* ist in der Lage verschiedene Wachstumsformen anzunehmen. So kann er unter normalen Laborbedingungen, bei 30 °C und hoher Glukosekonzentration, als kugelige Blastospore isoliert werden. Verändert man jedoch die Laborbedingungen durch z. B. Erhöhung



**Abb. 1: Morphologische Formen von *C. albicans* und ihre Entstehung (Ernst, 2000).** Die Hefeform und die Hyphenform ist die vorherrschende Wachstumsform bei Infektionen. Chlamydosporen sind dickwandige elongierte Suspensorzellen auf Pseudohyphen. Die Hefezellen können zu einer *opaque*-Form wechseln

der Temperatur auf 37 °C, neutralen pH, durch Zugabe von Serum, N-Acetylglukosamin oder Prolin (Land *et al.*, 1975; Buffo *et al.*, 1984; Cassone *et al.*, 1985), so fängt die Hefezelle an, filamentös zu wachsen. Hierbei muss man zwischen einer echten Hyphenzelle und einer Pseudohypha unterscheiden. Diese beiden Phänotypen unterscheiden sich in ihrer Entstehung. Während die echte Hypha durch ein kontinuierliches, apikales Wachstum und durch das spätere Einziehen von Septen entsteht, wird die Pseudohypha durch unipolare Knospung gebildet, wobei die elongierte Tochterzelle nicht den Kontakt zur Mutterzelle verliert (Odds *et al.*, 1988; Ernst, 2000) (Abb. 1).

Eine weitere morphologische Erscheinungsform von *C. albicans* sind die Chlamydosporen (Abb. 1). Diese Sporen sind dickwandige, stark lichtbrechende Zellen, die an den Enden von elongierten Suspensorzellen auf Hyphen oder Pseudohyphen entstehen (Joshi *et al.*, 1993). Diese Zellen lassen sich unter nährstoffarmen, sauerstoffarmen Bedingungen und bei geringer Temperatur induzieren. *In vitro* werden Chlamydosporen auf Maismehl-Agarpatten induziert, wobei Glukose diese Wachstumsform unterdrücken (Dujardin *et al.*, 1980b, 1980a). Die genaue Funktion dieser Zellen ist noch unklar, obwohl eine Funktion als Überdauerungsform diskutiert wird (Joshi *et al.*, 1993). Neben diesen Phänotypen ist dieser Pilz in der Lage

zwischen zwei weiteren morphologischen Wachstumsformen, den *white*- und *opaque*-Zellen (Abb. 1), zu wechseln. *white*-Zellen sind normale runde Zellen, während die *opaque*-Zellen elongierte, stäbchenförmige Zellen bilden, die an der Oberfläche punktförmige Auswüchse, so genannte „Pimples“ ausbilden. Ihre Kolonieförmigkeit ist flach und gräulich, im Gegensatz zu den etwas erhobenen, weißen Kolonien der *white*-Zellen. (Slutsky *et al.*, 1987). Diese beiden Wachstumsformen unterscheiden sich nicht nur in der Morphologie, sondern zugleich auch durch ihre Funktionsweisen in verschiedenen Bereichen. So werden ca. 400 Gene, aus den funktionellen Bereichen Adhäsion, Resistenz, Metabolismus, Virulenz und Paarung, signifikant unterschiedlich in den beiden Zellen exprimiert (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Diese unterschiedliche Genexpression erklärt die unterschiedliche Funktion dieser Wachstumsformen. So sind die *white*-Zelle eher für die Verbreitung im Blutkreislauf und die *opaque*-Zelle eher für die Kolonialisierung der Zelloberfläche zuständig (Kvaal, C.A. *et al.*, 1997; Kvaal, C. *et al.*, 1999; Lachke *et al.*, 2003). Auch haben diese Zelltypen beim Paarungsprozess eine Schlüsselrolle. Es konnte gezeigt werden, dass die *opaque*-Zelle die paarungskompetentere Form darstellt, während die *white*-Zellen diese Fähigkeit kaum entwickeln (Miller, M.G. und Johnson, 2002). Demnach scheinen diese beiden Phänotypen eine wichtige Funktion bei der Pathogenese und beim Paarungsprozess zu haben (Zordan *et al.*, 2006).

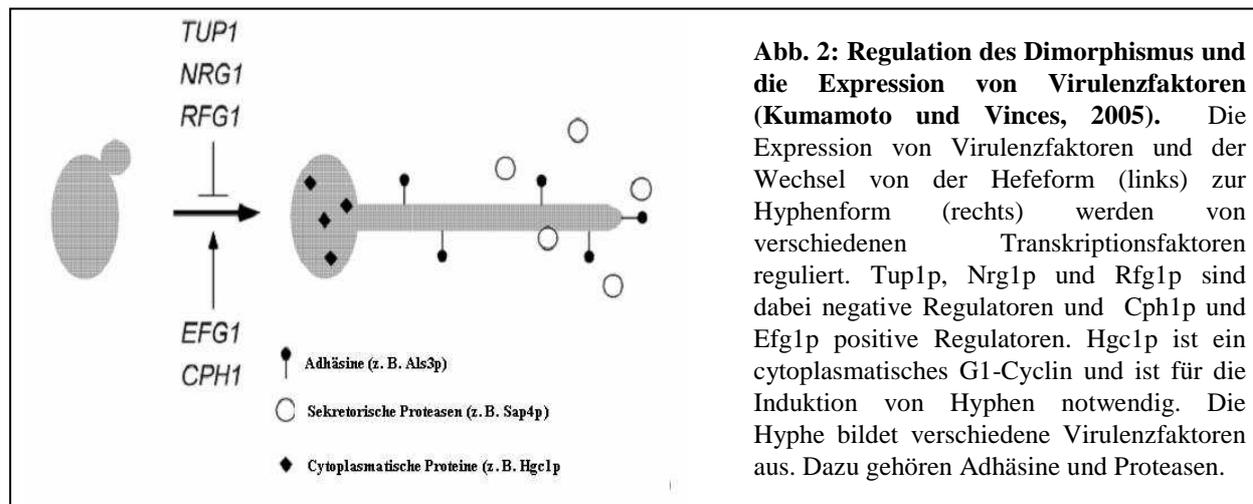
## 1.2 Dimorphismus – ein wichtiger Virulenzfaktor

Als eine der wichtigsten Phänotypen für die Virulenz wird der Wechsel zwischen Hefe und Hyphenform (Dimorphismus) angesehen. Die einzellige Blastospore ist in der Lage sich schnell zu vermehren und kann schnell über den Blutkreislauf im gesamten Körper verteilt werden. Die Hyphenform hingegen ist für die Adhäsion an Epithelien und für die Penetration in tiefere Gewebeschichten notwendig. Dieses ist möglich, da gleichzeitig mit der Hyphenbildung die Expression von Virulenzfaktoren, wie z.B. Proteasen und Adhäsine, eingeleitet werden (Kumamoto und Vines, 2005).

Ein wichtiger Induktor für die Hyphenbildung ist der Transkriptionsfaktor Efg1p (Stoldt *et al.*, 1997). Neben diesem Transkriptionsfaktor spielt Cph1p, das homologe Protein zu Ste12p in *S. cerevisiae*, ebenfalls eine Rolle (Liu *et al.*, 1994). Eine Doppelmutante *cph1/cph efg1/efg1* zeigt einen starken Defekt im filamentösen Wachstum (Lo *et al.*, 1997). Parallel zu diesen positiven Regulatoren existieren Proteine, die eine reprimierende Funktion auf die Hyphenbildung ausüben. Bekannte Repressoren sind hierbei Nrg1p, Tup1p und Rfg1p. *nrg1*-Mutanten zeigen eine dereprimierte Filamentbildung und sind avirulent (Murad *et al.*, 2001b). *NRG1* wird während der Hypheninduktion reprimiert (Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b) und bei einer konstitutiven Expression von *NRG1* wird die Bildung von Hyphen unterdrückt (Braun *et al.*, 2001). Auch die Mutanten für die beiden anderen Transkriptionsfaktoren zeigen ein ähnliches Verhalten (Kadosh und Johnson, 2001; Murad *et al.*, 2001a; Murad *et al.*, 2001b).

Wird die Hyphenform induziert, so werden von der Hyphe Virulenzfaktoren gebildet (Abb. 2). *HGCI* ist ein cytoplasmatisches G1-Cyclin, welches nicht in der Hefe exprimiert wird und für die Induktion von Hyphen notwendig ist. *hgc1*-Mutanten können normal als Hefezelle wachsen, haben jedoch einen Defekt in der Hyphenform und sind avirulent (Zheng und Wang, 2004). Sekretorische Aspartatproteasen (SAPs) werden während der Hypheninduktion sekretiert und sind für die Invasion und Penetration des Wirtsgewebes notwendig. Sie haben aber auch die Aufgabe wirtsspezifische Abwehrproteine zu degradieren (Naglik *et al.*, 2003). Neben diesen Proteasen haben die Adhäsine eine wichtige Funktion für die Erkennung und die Anheftung an Wirtszellen. Die *ALS*-Genfamilie kodiert für Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte

Zellwandglykoproteine (Sundstrom, 2002) und sind für die Anheftung an Endothel- und Epithelzellen verantwortlich (Fu *et al.*, 2002).



Auch wenn die Hyphenform die mehr virulente Form von *C. albicans* zu sein scheint, ist die Hefeform ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Pathogenität dieses Pilzes, denn eine konstitutiv filamentöse Wachstumsform verliert gleichermaßen an Virulenz (Gow *et al.*, 2002). Die Fähigkeit von *C. albicans* von einer Wachstumsform in den nächsten zu wechseln hat einen großen Einfluss auf seine Pathogenität, da er sich so an verschiedene Gegebenheiten anpassen kann (Kumamoto und Vices, 2005).

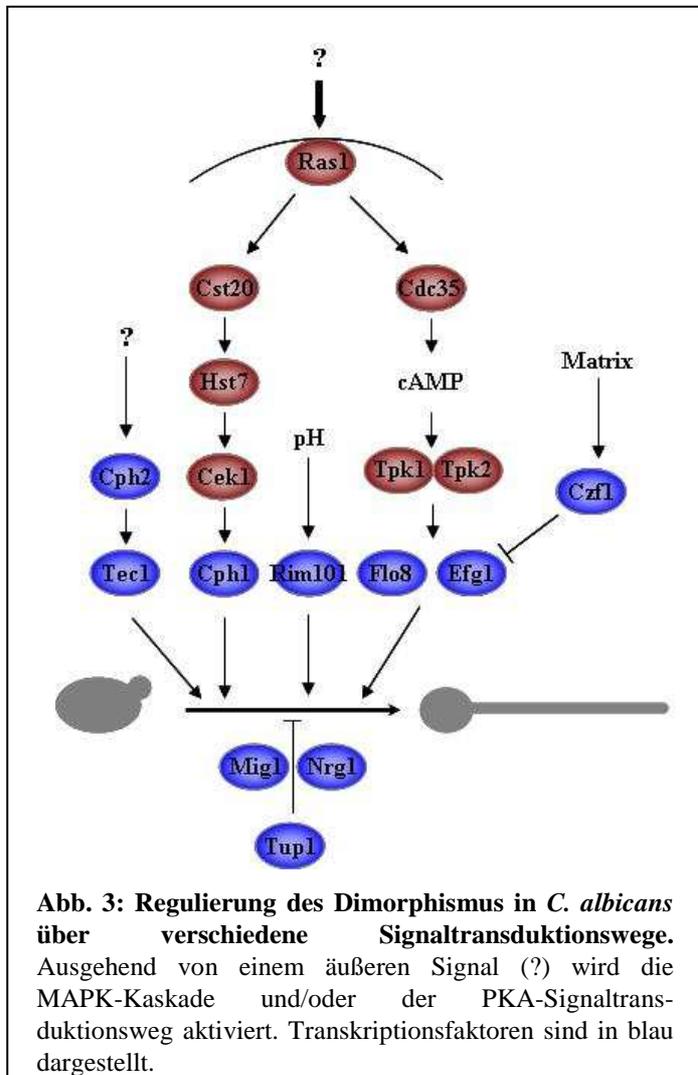
### 1.3 Regulation des Dimorphismus

Der Dimorphismus wird von verschiedenen Signaltransduktionswegen reguliert (Abb. 3), die weitestgehend noch ungeklärt sind. Die beiden bestuntersuchten Signalwege sind der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Weg (MAPK) und der cAMP-abhängige Proteinkinase A-Weg (PKA), die durch ihre Homologie zu den Signaltransduktionswegen in *S. cerevisiae* teilweise erschlossen werden konnten.

Der MAPK-Signalweg wird ausgehend vom monomeren G-Protein Ras1p (Gimeno *et al.*, 1992; Leberer *et al.*, 2001), über die Kinasen Cst20p, Hst7p, Cek1p und anschließend durch den Transkriptionsfaktor Cph1p reguliert (Abb. 3). Die homologe Kaskade in *S. cerevisiae* reguliert die Pseudohyphenbildung und die Paarungsantwort. In *C. albicans* wird das Paarungsverhalten ähnlich reguliert (Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002), während das filamentöse Wachstum nur beschränkt beeinflusst wird. So zeigen MAP-Mutanten einen Defekt in der Hyphenbildung auf festen Spider-Platten, können jedoch auf Serum-Platten weiterhin filamentös wachsen (Liu *et al.*, 1994; Köhler und Fink, 1996; Csank *et al.*, 1998).

Als ein weitaus wichtigerer Signalweg für die Regulation des Dimorphismus wird der PKA-Weg angesehen. Die meisten Mutanten dieses Signalweges zeigen einen völligen Verlust der Hyphenbildung und eine reduzierte Virulenz (Feng *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2001; Miwa *et al.*, 2004; Maidan *et al.*, 2005). Die Signalübertragung von der Zelloberfläche verläuft wie bei der MAPK-Kaskade über das Ras1p, das die Adenylatcyclase (Cdc35p) aktiviert, wodurch der cAMP-Spiegel in der Zelle ansteigt und die Proteinkinase A aktiviert wird. Durch die Aktivierung wird die inhibierende regulatorische Untereinheit (Bcy1p) von der katalytischen Untereinheit freigesetzt. Im Gegensatz zu den katalytischen Untereinheiten aus *S. cerevisiae*, zu denen drei Isoformen Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p existieren, besitzt die PKA in *C. albicans* nur

zwei Isoformen Tpk1p und Tpk2p (Bockmühl *et al.*, 2001). Beide Tpk-Proteine wirken positiv auf die Hyphenbildung, haben aber unterschiedliche regulatorische Funktionen. So moduliert Tpk1p das filamentöse Wachstum eher auf festen Medien, während Tpk2p eher für die Regulation im flüssigen Medium verantwortlich ist (Cassola *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* hat die Proteinkinase A eine vielseitige Funktion und reguliert neben dem pseudohyphalen Wachstum den oxidativen, osmotischen und hitzebedingten Stress, sowie den Kohlehydratstoffwechsel und die Eisenaufnahme (Smith *et al.*, 1998; Charizanis *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2000). Eine solche Stressregulation scheint in *C. albicans* generell nicht vorhanden zu sein (Enjalbert *et al.*, 2003). Vielmehr ist der PKA-Weg für die Induktion von Hyphen wichtig und aktiviert schließlich den Transkriptionsfaktor Efg1p, der als zentraler Regulator der Morphogenese angesehen wird. (Stoldt *et al.*, 1997; Bockmühl und Ernst, 2001). Die *EFG1*-Disruptionsmutante zeigt unter fast allen hypheninduzierenden Bedingungen eine völlige Hemmung des hyphalen Wachstums (Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000). Nur unter anaeroben Bedingungen konnte eine vermehrte Bildung von Hyphen beobachtet werden (Sonneborn *et al.*, 1999a; Setiadi, E.R. *et al.*, 2006). Der Transkriptionsfaktor Flo8p wird ebenfalls über den PKA-Weg reguliert und leitet möglicherweise mit Efg1p die Hyphenbildung ein. *flo8*-Mutanten zeigen ein ähnliches Verhalten wie *efg1*-Mutanten (Cao *et al.*, 2006).



**Abb. 3: Regulation des Dimorphismus in *C. albicans* über verschiedene Signaltransduktionswege.** Ausgehend von einem äußeren Signal (?) wird die MAPK-Kaskade und/oder der PKA-Signaltransduktionsweg aktiviert. Transkriptionsfaktoren sind in blau dargestellt.

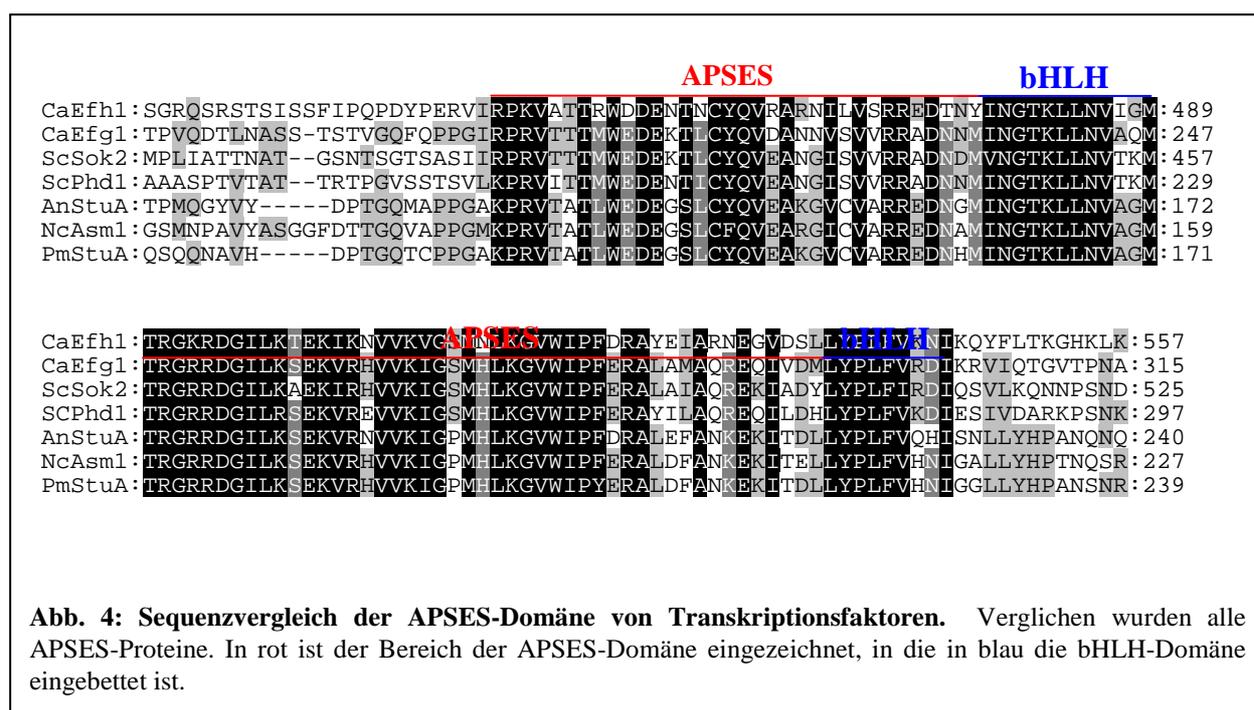
Neben diesen beiden Signalwegen gibt es noch weitere Proteine und Kaskaden, die den Wechsel von Hefe zur Hyphe regulieren. So gelten die Transkriptionsfaktoren Cph2p, Tec1p und Rim101p als Aktivatoren der Hyphenbildung (Davis, D. *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2001a; Lane *et al.*, 2001b). Alle Stämme mit Mutationen in diesen Genen zeigen unterschiedliche Defekte in der Hyphenbildung.

Dem gegenüber stehen die drei Transkriptionsfaktoren Mig1p, Nrg1p und Tup1p, die als Repressoren fungieren. Die Regulation der Gene wird hierbei über Mig1p und Nrg1p gesteuert, die das Tup1 Protein gezielt zu spezifischen Promotoren rekrutiert (Murad *et al.*, 2001a). Das Zinkfinger-Protein Czf1p ist ebenfalls ein wichtiger Regulator für den Dimorphismus, wenn die Zellen von einer Matrix umgeben werden (Brown *et al.*, 1999). Bei einer Überexpression von Czf1p in einer *efg1*-Mutante konnte kein Effekt auf die Hyphenbildung beobachtet werden (Giusani *et al.*, 2002). Vielmehr erleichtert Czf1p die reprimierende Funktion von Efg1p unter anaeroben Bedingungen (Vinces *et al.*, 2006).

## 1.4 Der Transkriptionsfaktor Efg1p

### Efg1p - Ein Protein der APSES-Familie

Das *EFG1* (Enhance Filamentous Growth 1)-Gen umfasst ein offenes Leseraster von 1656 bp und kodiert für ein 552 AS langes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 61 kDa. Die Aminosäuresequenz zeigt eine auffällige Zusammensetzung, bestehend aus 19 % Glutamin, 10 % Alanin und Threonin, sowie jeweils 9 % Serin und Prolin. Der Transkriptionsfaktor Efg1p wurde durch die Expression einer *C. albicans*-Genbank in *S. cerevisiae* als Auslöser pseudohyphalen Wachstums identifiziert (Stoldt *et al.*, 1997). Sequenzvergleiche von Efg1p offenbarte eine hohe Homologie zu einer kleinen Proteinfamilie, die speziell nur in Ascomyzeten gefunden werden kann. Diese Proteinfamilie wurde nach den Anfangsbuchstaben der zuerst identifizierten Proteine benannt und trägt den Namen APSES (Asm1p, Phd1p, Sok2p, Efg1p und StuAp). Das charakteristische an dieser Proteinfamilie ist die so genannte APSES-Domäne, die in allen Mitgliedern hoch konserviert ist (Abb. 4). Diese 100 Aminosäuren umfassende Domäne ist durch eine basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Domäne charakterisiert. Außerhalb dieser APSES-Domäne zeigen diese Proteine keinerlei Ähnlichkeiten. Interessanterweise regulieren alle Proteine dieser Familie morphogenetische Prozesse. Asm1p aus *Neurospora crassa* reguliert die Ascosporenreife (Aramayo *et al.*, 1996), Phd1p und Sok2p aus *S. cerevisiae* regulieren antagonistisch die Pseudohyphenbildung (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995) und StuAp aus *Aspergillus nidulans* ist für die Bildung der Konidiosporen zuständig (Dutton *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 2005). In *Penicillium marneffei* konnte ein weiteres APSES-Protein (PmStuAp), das die Konidiosporenbildung reguliert, der Familie hinzugefügt werden (Borneman *et al.*, 2002). Da bereits viele Proteine in *C. albicans* durch die Homologie zu *S. cerevisiae* identifiziert wurden, wurde angenommen, dass *C. albicans* ebenfalls zwei Mitglieder der APSES-Proteinfamilie besitzt. Durch Datenbankanalysen wurde ein weiteres Protein dieser Familie zugeordnet. Wegen seiner Homologie zu Efg1p wurde es Efh1p (Efg1p Homologes) genannt (Doedt *et al.*, 2004). In einem Ein-Hybrid-Experiment wurde bereits gezeigt, dass auch diese beiden Proteine eine antagonistische Funktionsweise zeigen. So fungiert in diesem System Efg1p als Repressor, während Efh1p auf eine aktivierende Funktion hinweist (Doedt *et al.*, 2004).



Durch das bHLH-Motiv in der APSES-Domäne kann Efg1p zu der Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren gezählt werden. Es wurde nachgewiesen, dass der basische Teil für die DNA-Bindung und die Helix-Loop-Helix Region für die Dimerisierung benötigt wird (Murre *et al.*, 1989; Ellenberger *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994). Myc, Max und MyoD sind gut untersuchte Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe, die eine Homologie zu Efg1p in der bHLH-Domäne aufweisen. Myc und Max regulieren Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung und die Apoptose in Säugerzellen. Der Transkriptionsfaktor MyoD reguliert die Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen. Auf Grund der Homologie wurde vermutet, dass Efg1p, ebenso wie diese Transkriptionsfaktoren, E-Boxen mit der palindromischen Sequenz 5'-CANNTG-3' bindet. Eine *in vitro* Bindung mit einem heterolog synthetisierten Efg1p an ein Fragment des ALS8-Promotors, welche die E-Box 5'-CATTTG-3' enthält, konnte nachgewiesen werden (Leng *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis wurde jedoch in einem *in vivo* Ein-Hybrid-Experiment nicht bestätigt (Hilbig, 2004). Neben diesen Ergebnissen wurde durch eine *in vitro* Footprint-Analyse gezeigt, dass Efg1p an eine E-Box 5'-CATATG-3' im eigenen Promotorbereich bindet. So konnte bisher nur eine DNA-Bindung an eine E-Box durch Efg1p *in vitro* beobachtet werden. Auf Grund der Tatsache, dass die Bindspezifität durch die Variabilität der Dimerisierungspartner verändert wird, ist die Möglichkeit gegeben, dass ein bHLH-Protein andere DNA-Sequenzen ebenfalls binden kann (Robinson und Lopez *et al.*, 2001). Durch *in vivo* Studien wurde eine Bindung an das MCB (*Mlu*I Cell cycle **B**ox)-Elemente durch Efg1p belegt (Doedt, 2000; Hilbig, 2004). MCB-Elemente sind bekannt aus *S. cerevisiae* und kommen überwiegend in Promotoren von Zellzyklus regulierten Genen vor (McIntosh, 1993). Diese DNA-Sequenz 5'-ACGCGT-3' wird von dem MBF (MCB-Binding-Factor)-Komplex gebunden, der aus den Proteinen Mbp1p und Swi6p besteht. Auf Grund der Homologie der N-terminalen Bindedomäne von Mbp1p und der APSES-Domäne von Efg1p wurde vermutet, dass Efg1p ebenfalls diese Sequenz binden kann. Interessanterweise wurde bisher das MCB-Element als einzige DNA-Sequenz identifiziert, die *in vivo* durch APSES-Proteine gebunden werden. So wurde in *C. albicans* durch Ein-Hybrid-Experimente bestätigt, dass Efg1p an diese Sequenz bindet (Hilbig, 2004). Neben Efg1p ist auch das APSES-Protein StuA in der Lage an das MCB-Element zu binden (Dutton *et al.*, 1997). Durch das Durchsuchen einer Ein-Hybrid-Oligonukleotid-Bank wurde ein STRE-Element ähnliche DNA-Sequenz 5'-CCACTT-3' identifiziert, die *in vivo* durch Efg1p in *S. cerevisiae* erkannt wird (Hilbig, 2004). Diese DNA-Elemente kommen in *S. cerevisiae* in Promotoren von Genen vor, die bei der Stressantwort eine Rolle spielen. Durch ein *in vivo* Ein-Hybrid-Experiment wurde jedoch keine Bindung von Efg1p an 5'-CCACTT-3'-Sequenz in *C. albicans* beobachtet (Bußmann, 2006).

### Interaktionspartner

Wie bereits erwähnt, wird die DNA-Bindspezifität durch den Dimerisierungspartner bestimmt. So kann der Transkriptionsfaktor Myc durch verschiedene Dimerisierungspartner aktivierend bzw. reprimierend wirken (Bernards, 1995). Bisher sind keine Dimerisierungspartner und keine Homodimer-Bildungen von Efg1p bekannt. Allerdings deuten Zwei-Hybrid-Experimente darauf hin, dass Efh1p mit sich selber dimerisieren kann (Bockmühl, 2000). Bislang wurden drei Interaktionspartner von Efg1p identifiziert. Einer dieser drei Interaktionspartner ist das Sin3-Protein, welches vermutlich eine wichtige Funktion bei der negativen Autoregulation hat und im späteren Teil näher erläutert wird. Neben dieser Wechselwirkung mit Sin3p wurde ebenfalls eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Czf1p nachgewiesen (Giusani *et al.*, 2002; Vinces *et al.*, 2006). Czf1p ist ein Zinkfinger-Protein, das die Hyphenbildung von *C. albicans* unter Einbettung in eine Agar-Matrix reguliert (Brown *et al.*, 1999). In einer Zwei-Hybrid-Analyse wurde eine Interaktion zwischen Efg1p und Czf1p gezeigt (Giusani *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde durch eine Chromatin-Immünpräzipitations(ChIP)-Analyse beobachtet, dass beide

Proteine an den *CZFI*-Promotor binden und dessen Expression regulieren (Vinces *et al.*, 2006). Eine weitere Interaktion zwischen Efg1p und dem Transkriptionsfaktor Flo8p wurde durch eine Immunpräzipitation bestätigt. Flo8p reguliert vermutlich unterhalb des PKA-Weges hyphenspezifische und Virulenz-relevante Gene. *flo8*-Mutanten zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *efg1*-Mutanten, und eine Synthese von Efg1p in *flo8*-Mutanten, führt zu Stämmen, die nicht in der Lage sind filamentös zu wachsen. Dies verdeutlicht, dass Efg1p für seine Aktivität Flo8p benötigt (Cao *et al.*, 2006).

### Posttranslationale Modifizierung

Neben der Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Interaktionspartner können Proteine ebenfalls regulatorische Signale in Form von posttranslationalen Modifikationen erhalten. Efg1p hat eine errechnete Molekularmasse von 61 kDa. Wird dieses Protein in *E. coli* exprimiert, so wird es bei der errechneten Größe im Immunoblot nachgewiesen (Doedt, 2000). Bei einer Expression in *S. cerevisiae* oder in *C. albicans* wird Efg1p jedoch bei einer molekularen Masse von 90 kDa als Dreifach-Bande detektiert (Sonneborn, 1999). Dieses Phänomen lässt vermuten, dass Efg1p in beiden Hefe-Stämmen posttranslational modifiziert wird. Nach einer Inkubation eines *C. albicans* Rohextraktes mit alkalischer Phosphatase konnte belegt werden, dass die oberen Banden durch Phosphorylierungen am Efg1p entstehen (Bockmühl, 2001). Bei einer Immunoblot-Analyse konnte mit Hilfe eines Anti-Phospho-Threonin-Antikörpers eine Phosphorylierung in einer der oberen Banden nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpern erbrachte keine Signale im Efg1p (Bockmühl, 2001). Im Efg1p existiert eine Konsensussequenz R-V-T der Proteinkinase A an der Stelle T206. Ein Austausch dieses Threonins gegen ein Alanin führt zu einer Variante, die nicht phosphoryliert werden kann. Diese Mutanten zeigen einen Defekt in der Hyphenbildung (Bockmühl und Ernst, 2001). Wird hingegen dieses Threonin durch ein Glutamat ausgetauscht, so wird durch die negative Ladung der Carboxylgruppe eine permanent phosphorylierte Form imitiert. Diese Mutanten weisen ein hyperfilamentöses Wachstum auf (Bockmühl und Ernst, 2001). In Anbetracht dieser Tatsachen scheint diese Phosphorylierungsstelle eine wichtige Funktion für die Regulation von Efg1p zu haben. Bisher konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen Efg1p und der Proteinkinase A in *C. albicans* durch Zwei-Hybrid-Experimente nachgewiesen werden (Bockmühl, 2001). Diese Daten lassen darauf schließen, dass Efg1p an mehreren Stellen phosphoryliert wird. Auch konnte mit Hilfe eines *O*-GlcNAc-Antikörpers ausgeschlossen werden, dass Efg1p *O*-glykosyliert wird (Sonneborn, 1999). Letztendlich kann mit diesen Fakten nicht geklärt werden, an welchen weiteren Stellen Efg1p phosphoryliert ist, noch warum Efg1p ein elektrophoretisches Laufverhalten eines etwa 30 kDa größeren Proteins aufweist.

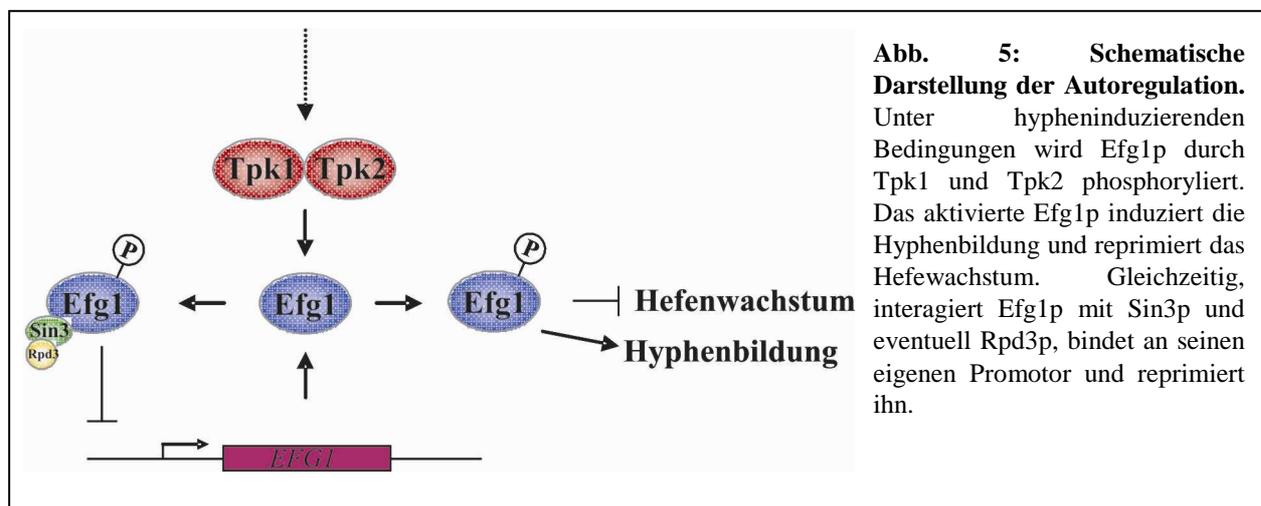
### Funktion

Als zentraler Regulator ist Efg1p nicht nur ein Schlüsselenzym des Dimorphismus, sondern ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Bildung von Chlamydosporen und für den spontanen Phänotypwechsel zwischen *opaque*- und *white*-Zellen. So konnten Sonneborn *et al.* (1999) zeigen, dass bei einer Überexpression von Efg1p in *opaque*-Zellen diese forciert werden, zu *white*-Zellen zu wechseln. Auch zeigte sich nach einer Untersuchung des *EFG1* Transkriptspiegels, dass *EFG1* hauptsächlich in *white*-Zellen exprimiert wird und für den Wechsel von *opaque*- zu *white*-Zellen benötigt wird (Srikantha *et al.*, 2000). Interessanterweise besitzt *EFG1* zwei unterschiedlich stark transkribierte Transkripte. In *C. albicans* kann eine 3,2 kb große und eine 2,2 kb große mRNA, die 20fach geringer transkribiert wird, detektiert werden (Tebarth *et al.*, 2003). Es wurde beobachtet, dass in *white*-Zellen ausschließlich das

3,2 kb Transkript zu detektieren ist, während in den *opaque*-Zellen kaum bzw. keine mRNA gebildet wird (Srikantha *et al.*, 2000, Sonneborn *et al.*, 1999).

Bei einer Inkubation von *efg1*-Mutanten unter mikroaeroben Bedingungen auf Maismehlagar-Platten, zeigten diese einen Verlust an Chlamydosporen. Interessanterweise ergab sich in diesem Zusammenhang eine wichtige Beobachtung. Diese unter normalen aeroben Bedingungen a-filamentösen *efg1*-Mutanten waren unter diesen Sauerstoffmangel-Bedingungen hyperfilamentös (Sonneborn *et al.*, 1999a). Parallel hierzu konnte ebenfalls bei Matrix-Einbettungen ein filamentöses Wachstum bei *efg1*-Mutanten beobachtet werden (Brown *et al.*, 1999). Kürzlich durchgeführte Versuche deuten darauf hin, dass Efg1p unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur <37 °C und/oder saurem pH eine reprimierende Funktion auf die Hyphenbildung ausübt (Setiadi, E.R. *et al.*, 2006). Es scheint, dass Efg1p unter aeroben Bedingungen für die Induktion von Hyphen aktivierend wirkt und unter anaeroben Bedingungen als Repressor fungiert.

Während der Hypheninduktion wird das größere 3,2 kb Haupt-Transkript durch negative Autoregulation reprimiert (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Verhindert man diese



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Autoregulation.** Unter hypheninduzierenden Bedingungen wird Efg1p durch Tpk1 und Tpk2 phosphoryliert. Das aktivierte Efg1p induziert die Hyphenbildung und reprimiert das Hefewachstum. Gleichzeitig, interagiert Efg1p mit Sin3p und eventuell Rpd3p, bindet an seinen eigenen Promotor und reprimiert ihn.

Repression, so bilden die Zellen Pseudohyphen anstelle von echten Hyphen (Tebarth, 2001). In einer Chromatin-Immunpräzipitations(ChIP)-Analyse wurde eine direkte Interaktion zwischen Efg1p und dem *EFG1*-Promotor nachgewiesen (Doedt, 2004). Weitere Experimente lassen vermuten, dass Efg1p mit dem Histondeacetylase-Komplex Rpd3p/Sin3p interagiert und so sein eigenes Transkript reguliert (Abb. 5). In einer Zwei-Hybrid-Analyse wurde eine Interaktion zwischen Efg1p und Sin3p nachgewiesen, und das Fehlen der Autoregulation in einer *sin3*-Mutante gezeigt (Tebarth *et al.*, 2003).

Neben den morphogenetischen Prozessen reguliert Efg1p ebenfalls die Induktion von vielen Virulenzfaktoren. Während der Hyphenbildung ist die Expression der Proteasen SAP4, SAP5 und SAP6 Efg1p abhängig (Schröppel *et al.*, 2000). Auch die Expression der Adhäsine Als1p, Als3p und Hwp1p wird durch Efg1p aktiviert (Hoyer *et al.*, 1998; Sharkey *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2002). Es zeigte sich, dass *efg1*-Mutanten einen deutlichen Defekt in der Adhäsion an Säugerzellen und zu abiotischen Oberflächen aufweisen, da sie keine Adhäsine exprimieren können (Kumamoto und Vincles, 2005). Weitere Efg1p-abhängige Virulenzfaktoren sind Rbt1p und Rbt4p, mit einer unbekanntem Funktion (Braun *et al.*, 2000), sowie das hyphenspezifische G1-Cyclin Hgc1p (Zheng und Wang, 2004). Als zentraler Regulator von Prozessen in *C. albicans* reguliert Efg1p auch den Metabolismus. So wurde in einer genomweiten Transkriptomanalyse von *efg1*-Mutanten gezeigt, dass fast alle glykolytischen Gene durch Efg1p aktiviert werden und Gene des oxidativen Stoffwechsels reprimiert werden (Doedt *et al.*, 2004).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor Efg1p reguliert als globaler Regulator morphologische, metabolische und Virulenz-relevante Prozesse in *C. albicans*. Obwohl viele Phänotypen bekannt sind, die durch Efg1p gesteuert werden, ist die genaue Funktionsweise von Efg1p noch weitestgehend ungeklärt. Über systematische Deletionsanalysen sollte das Efg1-Protein auf funktionelle Domänen untersucht werden. Hierfür wurden die Deletionen auf ihre morphologischen Phänotypen, auf ihre Repressor-Aktivität und auf Modifizierungen untersucht. Des Weiteren wurden Vorversuche durchgeführt, um Efg1p zu isolieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

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

### 2.2 Stämme

#### 2.2.1 *Escherichia coli* Stämme

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

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 $\alpha$ F'	F'[ $\Phi$ 80 ( $\Delta$ lacZ) M15] $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> supE44 thi-1 gyrA relA	Hanahan, 1983 Woodcock <i>et al.</i> , 1989

#### 2.2.2 Hefe Stämme

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete *Candida albicans* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CAF2-1	URA3/ ura3::imm434	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAI4	ura3::imm434/ura3::imm434	(Fonzi und Irwin, 1993)
TS3.3	opaque TS3.3 ura <sup>-</sup>	(Soll/Srikantha)
AS1	Wie CAI4, aber <i>tpk2::hisG/tpk2::hisG</i>	(Sonneborn, 1999)
IIHH6-4a	wie CAI4, aber <i>tpk1::hisG/tpk1::hisG</i>	(Bockmühl, 2001)
CAR23-7-5-1	wie CAI4, aber <i>rim15::hisG/rim15::hisG</i>	(Setiadi, E., 2002)
C4/d63	wie CAI4, aber <i>efh1::hisG/efh1::hisG-URA3- hisG</i>	(Doedt <i>et al.</i> , 2004)
HLC52	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLC67	wie CAI4, aber <i>efg1::hisG/efg1::hisG</i>	(Lo <i>et al.</i> , 1997)
HLCE	wie HLC67, aber <i>efg1::hisG/efg1::[EFG1p-URA3]</i>	Lengeler,

KC208	$\Delta$ <i>ura3::imm434/<math>\Delta</math><i>ura3::imm434;<math>\Delta</math><i>Carub1::hisG/<math>\Delta</math><i>Carub1::hisG</i></i></i></i>	pers.Mitteilung D. Kornitzer, pers. Mitteilung
CRC106	wie CAI8, aber mit <i>lexA-ADHI-lacZ::ADE2</i>	(Doedt, T. <i>et al.</i> , 2004)
HLCEEF1	wie HLC67, aber <i>efg1::hisG/efg1::[EFG1p-HA-EFG1-URA3]</i> (pTD38-HA/ <i>PacI</i> integriert in <i>EFG1p</i> )	diese Arbeit
HLCEEF1-D1	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D1</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D2	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D2</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D3	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D3</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D4	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D4</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D5	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D5</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D6	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D6</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D7	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D7</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D8	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D8</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D9	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D9</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D10	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D10</i>	diese Arbeit
HLCEEF1-D11	wie HLCEEF1, aber mit <i>EFG1-D11</i>	diese Arbeit
HLCPEF1	wie HLC67, aber <i>efg1::hisG/efg1::[PCK1p-HA-EFG1-URA3]</i> (pBI-HAHD/ <i>KpnI</i> integriert in <i>LEU2</i> )	diese Arbeit
HLCP	wie HLC67, aber <i>efg1::hisG/efg1::[PCK1p-URA3]</i> (pBI/ <i>KpnI</i> integriert in <i>LEU2</i> )	diese Arbeit
HLCPEF1-D1	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D1</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D2	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D2</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D3	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D3</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D4	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D4</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D5	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D5</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D6	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D6</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D7	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D7</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D8	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D8</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D9	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D9</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D10	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D10</i>	diese Arbeit
HLCPEF1-D11	wie HLCPEF1, aber <i>EFG1-D11</i>	diese Arbeit
LexA-EFG1-D1	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D1	diese Arbeit
LexA-EFG1-D2	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D2	diese Arbeit
LexA-EFG1-D3	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D3	diese Arbeit
LexA-EFG1-D4	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D4	diese Arbeit
LexA-EFG1-D5	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D5	diese Arbeit
LexA-EFG1-D6	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D6	diese Arbeit
LexA-EFG1-D7	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D7	diese Arbeit
LexA-EFG1-D8	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D8	diese Arbeit
LexA-EFG1-D9	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D9	diese Arbeit
LexA-EFG1-D10	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D10	diese Arbeit
LexA-EFG1-D11	CRC106 mit Clp-LexA-EFG1-D11	diese Arbeit

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

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1p-HIS3 GAL2p-ADE met2::GAL7p-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

## 2.3 Medien

### 2.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

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

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37 °C. Zur Selektion Plasmid-kodierter Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Festen Nährböden wurde 2 % Agar zugegeben.

### 2.3.2 Medien zur Anzucht von Hefe-Stämmen

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

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

S4D: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren, aber mit Ammoniumsulfat), 4 % Glukose; pH 6,9 mit NaOH eingestellt.

SCAA: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren, aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Casaminsäuren; pH 6,9 mit NaOH eingestellt.

Die Anzucht der Hefe Stämme erfolgte bei 30 °C. Bei Bedarf wurden Aminosäuren nach Zimmermann (1975) hinzugegeben. Bei festen Nährböden wurde 1,5 % Agar hinzugefügt.

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

Zur Hypheninduktion auf festen Nährmedien wurden Serum-Platten und Lee's-Platten verwendet. Die Serum-Platten enthielten 5 % Pferdeserum und 2 % Agar. Lee's Platten, die nach Angaben von Lee *et al.* (1975) hergestellt wurden, enthielten statt Glukose Mannitol als Kohlenstoffquelle. Die Zellen wurden vereinzelt, über mehrere Tage bei 37 °C inkubiert und fotografisch dokumentiert.

### 2.3.4 Hypheninduktion bei *C. albicans* in flüssigem Medium

Zur Hypheninduktion in flüssigem Medium wurden die Stämme über Nacht angezogen, in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde, das auf 37 °C vorgewärmte Induktionsmedium, auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft, bei 110 Upm und 37 °C inkubiert. Die Quantifizierung der Hyphen erfolgte durch Auszählung von 100 Zellen in 20 minütigen Abständen.

### 2.3.5 Induktion von Chlamydosporen in *C. albicans*

Die Induktion von Chlamydosporen erfolgte auf Maismehlagar-Platten (Corn Meal Agar von Difco) mit 0,5 % Tween 80 unter mikroanaeroben Bedingungen. Um eine mikroanaerobe Umgebung zu erzeugen wurden die Zellen vereinzelt und mit sterilen Deckgläsern abgedichtet. Diese Platten wurden mindestens fünf Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

## 2.4 Plasmide

### 2.4.1 In dieser Arbeit verwendete Basisplasmide

Name	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pMOS-BLUE	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Fa. Amersham
pBI-HAHYD	<i>PCK1p-HA-EFG1</i> -Fusion in pRC2312	Sonneborn <i>et al.</i> (2000)
pBI-HYD	<i>PCK1p-EFG1</i> -Fusion	Stoldt <i>et al.</i> (1997)
pTD38/HA	Ligation von EFG1-HA (aus pBI-HAHYD/ <i>BgIII</i> ) in pTD38	Lengeler, pers. Mitteilung
pBI-1	<i>CaPCK1p</i> in pRC2312	Rademacher, 1998
pMi-11	EFG1 Gen aus pBIST in pGEX3-3X, unter IPTG regulierbaren Promotor tac	Diss. Mirko Weide
Clp-LexA	<i>ACT1p-lexA</i>	Doedt, 2004
Clp-LexA-EFG1	<i>ACT1p-lexA-EFG1</i>	Doedt, 2004
p3xHA-SMT3	<i>PCK1p-HA-SMT3</i>	J. Konopka, pers. Mitteilung

### 2.4.2 In dieser Arbeit konstruierte Vektoren

Name	Beschreibung
pCN1	PCR Fragment <i>EFG1</i> -FLAG mit <i>Bam</i> HI in pMOS-BLUE
pCN2	<i>EFG1</i> -FLAG mit <i>Bam</i> HI aus pMOS-BLUE in pBI <i>BgIII</i>
pTD38-HA-D1	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D1
pTD38-HA-D2	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D2
pTD38-HA-D3	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D3
pTD38-HA-D4	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D4
pTD38-HA-D5	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D5
pTD38-HA-D6	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D6
pTD38-HA-D7	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D7
pTD38-HA-D8	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D8
pTD38-HA-D9	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D9
pTD38-HA-D10	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D10
pTD38-HA-D11	Wie pTD38/HA, aber mit <i>EFG1</i> -D11
pBI-HAHYD-D1	Wie pBI-HAHYD, aber mit <i>EFG1</i> -D1

pBI-HAHYD-D2	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D2
pBI-HAHYD-D3	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D3
pBI-HAHYD-D4	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D4
pBI-HAHYD-D5	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D5
pBI-HAHYD-D6	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D6
pBI-HAHYD-D7	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D7
pBI-HAHYD-D8	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D8
pBI-HAHYD-D9	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D9
pBI-HAHYD-D10	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D10
pBI-HAHYD-D11	Wie pBI-HAHYD, aber mit EFG1-D11
Clp-LexA-EFG1-D1	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D1
Clp-LexA-EFG1-D2	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D2
Clp-LexA-EFG1-D3	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D3
Clp-LexA-EFG1-D4	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D4
Clp-LexA-EFG1-D5	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D5
Clp-LexA-EFG1-D6	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D6
Clp-LexA-EFG1-D7	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D7
Clp-LexA-EFG1-D8	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D8
Clp-LexA-EFG1-D9	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D9
Clp-LexA-EFG1-D10	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D10
Clp-LexA-EFG1-D11	Wie Clp-LexA-EFG1, aber mit EFG1-D11

## 2.5 Primer

Tab. 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
D1.1	5'-CAACGTATTCTATACCCTATGTTAACCAACAGACTGGACAGACAG-3'
D1.2	5'-CTGTCTGTCCAGTCTGTTGGTTAACATAGGGTATAGAATACGTTG-3'
D2.1	5'-CAACAACAAGGACAACCAGGGTTAACCACAAGTGCTCCTAGTGG-3'
D2.2	5'-CCACTAGGAGCACTTGTGGTTAACCCCTGGTTGTCCTTGTGTTG-3'
D3.1	5'-CCACAACCTCAGCATTACGTTAACCCACGAGTAACAACACTAGG-3'
D3.2	5'-GGTAGTTGTTACTCGTGGGTTAACGTAATGCTGAGGTTGTGG-3'
D4.1	5'-CCAACCACCAGGAATCAGGTTAACGATTCAAACCGGAGTAACTC-3'
D4.2	5'-GAGTTACTCCGGTTTGAATCGTTAACCTGATTCCTGGTGGTTGG-3'
D5.1	5'-CCATGGCTCAACGTGAACAAGTTAACAATACCAAGGCTGCCACTGC-3'
D5.2	5'-GCAGTGGCAGCCCTTGGTATTGTTAACCTGTTACGTTGAGCCATGG-3'
D6.1.	5'-GCAGGTTCCACCACCTAGTGTTAACCTCATATCCATAACCAACAGC-3'
D6.2	5'-GTGTTGGTATGGATATGAGTTAACACTAGTGGTGGAACTGC-3'
D7.1	5'-GTGCTGCTAATAGTAGTTACGTTAACCAATCAGCTAGCACTGTTGC-3'
D7.2	5'-GCAACAGTGCTAGCTGATTGGTTAACGTAACACTATTAGCAGCAC-3'
D8.1	5'-CCAACCACCAGGAATCAACGGAACCAAATTGCTC-3'
D8.2	5'-GAGCAATTTGGTCCGTTGATTCCTGGTGGTTGG-3'
D9.1	5'-CAAATTGTGGATATGTTGTATCCTAATGCAGCTGCTG-3'
D9.2	5'-CAGCAGCTGCATTAGGATACAACATATCCACAATTTG-3'
D10.1	5'-GGAGTAACTCCTAATGCAAGTTCTAGCGGTAATGG-3'
D10.2	5'-CCATTACCGCTAGAACTTGCATTAGGAGTTACTCC-3'
D11.1	5'-CTACTGCTGCTACTGCTAATACCAAGGCTGCCACTG-3'
D11.2	5'-CAGTGGCAGCCTTGGTATTAGCAGTAGCAGCAGTAG-3'
EFG-c-3x Flag	5'-AATGGATCCTAATCACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAAATCGATGTCATGAT CTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCATCTTTCTTCTTTGGCAA CAGTGC-3'
EFG-Start-Bam	5'-TTAGGATCCATTAATGTCAACGTATTCTATACCC-3'

RPS10 hin	5'-GAAGTCGTTGACCCATTCAC-3'
URA3 her (2)	5'-GCAGAAACTCATGCCTCACC-3'
P1-3xMCB	5'-CAGTTATTACCCTCGAGACGCGTCTCGAGACGCGTCTCGAGACGCGTCTC GAGCAGATCCGCCAGG-3'
P2-3xMCB	5'-CCTGGCGGATCTGCTCGAGACGCGTCTCGAGACGCGTCTCGAGACG'CGT CTCGAGGGTAATAACTG-3
HA intern for	5'-GCTGCCACTGCCTACCCATACGACGTCCTCCAGACTACGCTACTTCTGCTTCG-3'
HA intern rev	5'-CGAAGCAGAAGTAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGGCAGTGGCAGC-3'
E-Box hin	5'-TATATATGCATATATGCATATGTGCATATACCAATTAGCA-3
E-Box her'	5'-TGCTAATTGGTATATGCACATATGCATATATGCATATATA-3'
E-Box +5 hin	5'-ACAAGTATATATGCATATATGCATATGTGCATATACCAATTAGCAACT-3'
E-Box +5 her	5'-AGTATTGCTAATTGGTATATGCACATATGCATATATGCATATATACTTGT-3'
E-Box +10 hin	5'-AATATACAAGTATATATGCATATATGCATATGTGCATATACCAATTAGCAAT ACTGCACA-3'
E-Box +10 her	5'-TGTGCAGTATTGCTAATTGGTATATGCACATATGCATATATGCATATATACTT GTATATT-3'

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

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

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke wurde die „Mini-Lysat“-Methode angewendet (Birnboim und Doly, 1979). DNA für präparative Zwecke wurde aus 50 ml LB Amp-Kulturen mit Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.6.2 Isolierung von genomischer DNA aus *C. albicans*

Die Präparation genomischer DNA erfolgte nach einer für *S. cerevisiae* entwickelten Methode (Sherman *et al.*, 1986). Dabei wurden die mit SCE/Zymolyase-Lösung behandelten Zellen (Sphäroplasten) durch Zugabe von SDS und Inkubation bei 65 °C aufgeschlossen. Die DNA wurde mit absolutem Ethanol (p.A.) gefällt und mit einer Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt.

### 2.6.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte entweder photometrisch bei 260 nm und 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989), oder durch visuelle Abschätzung im Agarosegel.

### 2.6.4 Agarose Gelelektrophorese

Je nach Größe der DNA wurde ein 0,7 - 2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid zur Auftrennung verwendet (Sambrook *et al.*, 1989) und unter UV-Licht fotografiert. Als Größenstandard diente *HindIII*- und *EcoRI/HindIII*-geschnittene  $\lambda$ -DNA (200 ng/ $\mu$ l) (MBI-Fermentas).

### 2.6.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mittels eines Skalpells aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (QIAGEN GmbH, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.6.6 5'-Dephosphorylierung linearisierter DNA

Um eine Religation linearisierter DNA zu vermeiden wurde diese am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde nach der Restriktionshydrolyse ein Überschuss an alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde 1/10 Volumen 200 mM EGTA hinzugegeben und 10 min bei 72 °C erhitzt.

### 2.6.7 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 X Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim). Bei glatten Enden erfolgte die Ligation über Nacht bei 16 °C, bei überhängenden Enden für 2 h bei Raumtemperatur. Das Verhältnis von Vektor zu Fragment entsprach in der Regel 1:3.

### 2.6.8 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis (1987) dient zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen und wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen, sowie die Elongationszeiten wurden den eingesetzten Primern, bzw. dem erwarteten PCR-Fragment angepasst. PCR-Fragmente wurden mit dem „QIAquick PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt.

### 2.6.9 Kolonie-PCR

Nach einer Transformation von *C. albicans* erfolgte zur Verifizierung der integrierten DNA eine Kolonie-PCR. Dafür wurde eine geringe Menge Zellmaterial in 40 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Diese Suspension wurde kurz abzentrifugiert und auf Eis gehalten. Für die PCR wurden 4 µl der Suspension in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die PCR wurde mit der Taq-Polymerase (Eppendorf) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.6.10 Mutagenese-PCR

Deletionen bzw. Insertionen wurden mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.6.11 Transformation von *E. coli*

*E. coli* wurde nach der Rubidiumchlorid Methode nach Hanahan (1983) transformiert.

### 2.6.12 Transformation von *S. cerevisiae*

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

### 2.6.13 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte mittels drei verschiedener Methoden. Um Plasmide zu transformieren wurde die Lithium-Acetat-Methode eingesetzt. Hierfür wurden 200 µl einer Übernachtskultur bei 5.000 Upm für 4 min abzentrifugiert und in 100 µl OSB (0,2 ml 1 M LiAc; 0,8 ml 50 % PEG 8000; 15 mg DTT; 250 µg Heringsperma-DNA) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 – 6 µg der zu transformierenden DNA wurden die Zellen für 30 min bei 43,5 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf Selektionsplatten ausplattiert und für mind. zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Integration von DNA-Fragmenten erfolgte nach Srikantha *et al.* (1995). Hierfür wurden 5 µg DNA in die sphäroplastierten Zellen transformiert. Die Transformation von nicht aufgereinigten PCR-Fragmenten wurde nach Mitchell (Wilson *et al.*, 2000) durchgeführt. 500 µl einer 5 ml YPD Übernachtskultur wurden mit 50 ml frischem YPD angeimpft. Bei 30 °C wurden die Zellen 4 Stunden bei 110 Upm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 erreicht wurde. Nach Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) wurde das Pellet mit 5 ml LATE-Puffer (0,1 M Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 0,5 ml desselben Puffers resuspendiert. Je Transformation wurden 0,1 ml Zellen mit 5 µl Heringsperma DNA sowie mit 80 µl PCR-Produkt bzw. mindestens 2-10 µg DNA versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG3350 in LATE-Puffer) hinzugefügt und die Probe nach kurzem Schütteln (2 sec) über Nacht bei 30 °C inkubiert. Dann folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min 3500 Upm), mit 1 ml TE-Puffer gewaschen, in 0,2 ml TE-Puffer resuspendiert und auf Selektionsmedien ausplattiert.

### 2.6.14 Southernblot-Analyse

Der Southernblot erfolgte nach der Methode von Southern (1975). Hierfür wurden 1,5 µg genomische DNA mit den gewünschten Restriktionsenzymen über Nacht geschnitten, gefällt, resuspendiert und mit Hilfe eines 1 %igen Agarosegels aufgetrennt. Der anschließende Transfer auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) erfolgte mit einer Vakuumblokkammer (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia). Zunächst wurde die im Gel aufgetrennte DNA 3 min mit Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), dann 3 min mit Neutralisierungspuffer (3 M Na-Acetat, pH 5,5) behandelt und anschließend mit Transferpuffer (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0) 45 min auf die Nylonmembran übertragen. Nach einer 3

minütigen UV-Fixierung (312 nm) der DNA erfolgte die Prähybridisierung und die Hybridisierung bei 68 °C mit einer Digoxigenin markierten Sonde.

Die Detektion erfolgte mit polyklonalen Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Durch die an die Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase kann mit NBT (0,388 mg/ml) und X-Phosphat (0,175 mg/ml) die hybridisierte Sonde durch eine blaue Färbung sichtbar gemacht werden.

## 2.7 Biochemische Methoden

### 2.7.1 Herstellung von Rohextrakten aus Hefe

Zur Rohextraktherstellung wurde eine 30 – 1000 ml Kultur auf  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft und bei einer Zelldichte von ca. 0,8 - 1,0 für 5 min bei 3. 500 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml  $dH_2O$  gewaschen, abzentrifugiert und für mind. 1 h bei -20 °C gelagert. Der Zellaufschluß erfolgte in ca. 400 - 2000  $\mu$ l Lysepuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 1 % Triton x 100; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA und pro 10 ml eine Tablette Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini) mit einem Volumen Glasperlen für 20 min auf einem Vibrax-Schüttler (VX 2E, Janke & Kunkel) bei 4 °C. Um Zelltrümmer und Glasperlen von dem klaren Rohextrakt zu trennen, wurde dieser für 2 min bei 13 000 Upm abzentrifugiert. Die Rohextrakte wurden bei -20 °C aufbewahrt oder für Versuche mit Enzymaktivitätsrelevanz bei 4 °C auf Eis gelagert.

### 2.7.2 Heterologe Expression in *E. coli*

Der *E. coli*-Stamm BL21 mit den gewünschten Plasmiden wurden in 10 ml LB-Amp Medium als Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 110 Upm inkubiert. 1 l Hauptkultur wurde mit 10 ml Vorkultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  zwischen 0,8 und 1 kultiviert. Die Überexpression des Zielgens erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) bei 30 °C und 110 Upm für mind. 4 h. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert, und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.7.3 Herstellung von Rohextrakten aus *E. coli*

Für den Zellaufschluss der Überexpressionskulturen wurden die Zell-Pellets in 30 ml PBS (8 mM Na-Phosphat pH 7,2; 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,5 mM  $KH_2PO_4$ ) resuspendiert und mit drei Tabletten Roche Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine dreimalige Passage durch eine vorgekühlte French-Press Zelle (SLM AMINCO\_Spectronic Instruments, Rochester; USA) bei einem Druck von 180 MPa. Anschließend wurde dem Rohextrakt 1 % Triton X-100 (Endkonzentration) hinzugegeben und auf Eis 30 min leicht geschüttelt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min. bei 10.000 Upm entfernt.

#### 2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976) mit dem Protein Assay Dye Reagent der Firma BioRad. Zu 5 µl Rohextrakt wurden 795 µl dH<sub>2</sub>O und 200 µl Reagenz hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Eppendorf Photometer. Als Standard diente eine BSA Eichkurve.

#### 2.7.5 Dephosphorylierung

50 µg Protein wurden mit 2 µl alkalischer Phosphatase bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 95 °C mit 4 x LDS-Ladepuffer aufgeköcht. Das Laufverhalten der dephosphorylierten Proteine wurde über ein SDS-Gel überprüft.

#### 2.7.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die abgewandelte Methode nach Laemmli (1970) verwendet. Zum Gießen von 8 %igen denaturierenden SDS-Gelen (Sambrook *et al.*, 1989) wurde die Apparatur von Hoefer Scientific (USA, San Francisco) verwendet. Alternativ wurde die XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen mit Tris-Glycin-SDS Gelen nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Proteinstandard diente der SeeBlue® Plus2 (prestained) Marker der Firma Invitrogen. Die Proteine wurden mit ¼ Volumen 4 x LDS-Ladepuffer (Invitrogen) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Anfärbung der Gele erfolgte entweder durch Coomassie R250 über Nacht und anschließender Entfärbung für mind. 2 h oder durch eine Silbernitratfärbung.

#### 2.7.7 Immunoblot-Analyse

Nach der Auftrennung in einem SDS-Gel lassen sich spezifische Proteine sensitiv durch eine Immunoblot-Analyse nachweisen. Proteine, die in der Hoefer Scientific Kammer aufgetrennt wurden, konnten in einer Tankblot-Kammer durch einen Elektrobplot auf eine Immobilon P-Membran (Millipore, Eschborn) übertragen werden (Towbin *et al.*, 1979). Protein-Gele aus der XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur wurden mittels Elektrobplot nach Herstellerangaben auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran für mind. 2 h in Blocking-Reagenz (1 % Blocking von Roche in TBST) geschüttelt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran 2 h mit einem Primärantikörper in 1 % Blocking-Reagenz inkubiert. Es folgten drei Waschschrte (15 min) mit TBST (0,1 % (w/w) Tween 20 in TBS), um nicht gebundene Antikörper von der Membran zu waschen. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation des Sekundärantikörpers in 1 % Blocking-Reagenz mit drei weiteren Waschschrten in TBST und einem Waschschrte in PBS. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenz-Substrates „Super-SignalULTRA“ (Pierce) nach Herstellerangaben und Röntgenfilmen (Fuji).

Tab. 5: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle	Verdünnung	Bezug
Anti-HA-POD	Monoklonal	Maus	1:2500	Sigma
Anti-HA	Monoklonal	Maus	1:5000	Sigma
Anti-Maus-POD	Monoklonal	Ratte	1:50 000	Sigma

### 2.7.8 Silbernitrat-Färbung

Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine lassen sich unter anderem durch Silbernitrat anfärben. Das SDS-Gel wurde für mind. 1 h oder über Nacht in einer Fixierlösung (400 ml EtOH 96%; 70 ml Essigsäure 100%; dH<sub>2</sub>O ad 1000 ml) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel bei RT für 30 min in 50 ml Sensitivierungslösung (300 ml EtOH 96%; 2,0 g Natriumthiosulfat; 68 g Natriumacetat; dH<sub>2</sub>O ad 1000 ml) mit frischem Glutaraldehyd (500 µl in 100 ml) inkubiert und dreimal 5 min bei RT in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss wurde das Inkubationsgefäß zum Schutz vor Licht mit Alufolie o.ä. eingepackt und das Gel für 20 min bei RT im Dunkeln in 50 ml Silbernitratlösung (1,0 g Silbernitrat/1 l) mit frischem Formaldehyd (40 µl (37%) ad 100 ml) geschwenkt. Das Gel wurde erneut in reichlich dH<sub>2</sub>O gewaschen. Schließlich wurde auf das Gel 50 ml Entwicklungslösung (2,5 g Natriumcarbonat/ 1 l) mit frischem 37%igem Formaldehyd (20 µl ad 100 ml) geben und solange bei RT geschwenkt, bis Proteinbanden in gewünschter Farbintensität sichtbar wurden. Die Farbreaktion wurde mit 100-200 ml Stopplösung (14,6 g EDTA / 1 l) beendet.

### 2.7.9 Coomassie-Färbung

Proteine in einem SDS-Gel lassen sich ebenfalls mit Coomassie anfärben. Diese Methode wurde nach Khang *et al.* (2002) durchgeführt. Das Gel wurde über Nacht in Coomassie-Lösung (0,02 % Coomassie Brilliant Blue G-250; 2 % Phosphorsäure (w/v); 5 % Aluminiumsulfat; 10 % Ethanol (v/v)) inkubiert und anschließend für mind. 2 h in Entfärberlösung (2 % Phosphorsäure (w/v); 10 % Ethanol (v/v)) geschüttelt.

### 2.7.10 Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay“)

Mit dem „X-Gal Overlay“-Assay (Suckow und Hollenberg, 1998) lässt sich die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität der verschiedenen Transformanten in der Ein-Hybrid Methode grob abschätzen. Dazu wurden jeweils 5 µl einer Übernachtskultur auf Platten getropft und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. 1 g Agarose wurde mit 10 ml H<sub>2</sub>O aufgekocht und mit 10 ml 1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,0 versetzt. Nach Abkühlen auf ca. 70 °C wurden dem Gemisch 50 µl SDS-Lösung (10 %) und 400 µl X-Gal-Lösung (5 mg/ml in DMF gelöst) zugesetzt. Jede Platte wurde mit 10 ml dieser Lösung überschichtet und nach dem Erkalten für 2 – 8 h bei 37°C inkubiert.

### 2.7.11 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (lacZ-Assay)

Zur genaueren Aktivitätsbestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase wurde die Methode von James *et al.* (1996) verwendet. Zunächst wurde die OD<sub>600</sub> der zu messenden Übernachtskulturen bestimmt und jeweils 1 ml Zellen bei 13.000 Upm für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l Lysepuffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) resuspendiert und für mind. 2 h bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bei 30 °C aufgetaut und mit 750  $\mu$ l Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mg/ml O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, pH 7,0) versetzt und bis zu einer Geldfärbung bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M NaCO<sub>3</sub> gestoppt und die Inkubationszeit (t) bestimmt. Nach einer kurzen Zentrifugation (13 000 Upm, 1 min) wurde die Extinktion bei 420 nm bestimmt. Die Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel ermittelt (Miller, J., ; Golemis und Khazak, 1994):  $(1000/t) \times (OD_{420}/OD_{600}) = y$  Miller-Units.

Es wurden von jedem Stamm doppelte Übernachtskulturen angeimpft und von diesen Kulturen wiederum Doppelbestimmungen angesetzt.

### 2.7.12 Ammoniumsulfatfällung

Bei dieser Technik der Proteinfällung wird der hydrophobe Effekt in der Lösung vergrößert und die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen gefördert. Zu einem Rohextrakt (RE) mit einem bekannten Volumen wurde eine errechnete Menge gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung hinzugegeben. Für die Berechnung der Ammoniumsulfat-Menge wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-Konz. im RE} \cdot \text{RE Volumen} - \text{gewünschte } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-Konz.} \cdot \text{RE Volumen}}{\text{Gewünschte } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-Konz} - 100 \%}$$

Dabei wurde die Proteinlösung stetig auf Eis gerührt und das Ammoniumsulfat tropfenweise, langsam hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung weitere 20 min auf Eis gerührt. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation für 30 min bei 20 000 Upm. Der Überstand wurde für weitere Fällungen eingesetzt und das Pellet in einem Puffer resuspendiert.

### 2.7.13 Immunpräzipitation

Der Zellaufschluss erfolgt zunächst wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben. Zu 200  $\mu$ l denaturierter Probe wurden 800  $\mu$ l IP-Dilutionspuffer (1,25 % Triton X-100; 6 mM EDTA; 60 mM Tris/HCl; pH 7,6) gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der Überstand in 1,5 ml „Safe-Lock“ Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Inkubation mit 5  $\mu$ l Anti-HA-Antikörper (Stratagene) bei 4°C über Nacht und leichtem Invertieren wurden die Proben mit 50  $\mu$ l 20 %iger Protein-A-Sepharose-Lösung (20 % Protein-A-Sepharose in IP-Puffer, siehe unten) versetzt und weitere 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit IP-Puffer (1 % Triton X-100; 0,2 % SDS; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Sepharose-Pellet wurde mit 50  $\mu$ l IP-Puffer, 50  $\mu$ l 4x LDS-Puffer und 100 mM

DTT versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Zur Auftrennung wurden 20 µl auf ein 8 %iges SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.7.6).

#### **2.7.14 Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose 4B**

Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteine wurden durch eine Glutathion Sepharose Matrix (Amersham) aufgereinigt. Hierfür wurde 1,33 ml Glutathion-Sepharose in ein 15 ml Polypropylen-Säule gefüllt. Dies ergab ein Bettvolumen von 1 ml. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml PBS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde auf die Säule der Rohextrakt gegeben. Um schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 40 ml PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde mit dem Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) die spezifischen Proteine isoliert. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt. Die Lokalisation des gewünschten Proteins erfolgte über SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Anfärbung in Coomassie R250.

#### **2.7.15 Affinitätschromatographie mit Anti-HA-Affinitäts-Matrix**

Verschiedene Efg1p-HA-Tag Varianten wurden mittels einer Anti-HA Affinitäts-Matrix (Roche) aufgereinigt. Die Säule umfasste ein Bettvolumen von 0,5 ml, die vor der Beladung mit 10 facher Bettvolumenmenge Equilibrierungspuffer (20 mM Tris, pH 7,5; 0,1 mM NaCl; 0,1 mM EDTA) vorbehandelt wurde. Der Rohextrakt wurde nach Kapitel 2.7.1 hergestellt und anschließend für 30 min bei 10.000 Upm abzentrifugiert.

Dieser Rohextrakt wurde bei 4 °C auf die Säule beladen und bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,3 – 0,5 ml/min über die Säule geschickt. Die Säule wurde anschließend mit 20fachen Bettvolumen Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,05 % Tween-20) gewaschen.

Für die Elution wurde ein Bettvolumen Elutionspuffer (HA Peptide in Equilibrierungspuffer) in die Säule einlaufen gelassen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt, und diese zur Überprüfung auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

#### **2.7.16 Kationenaustauscher-Säule**

Durch Kationenaustauscher können negativ geladene Proteine aufgereinigt werden. Als Kationenaustauscher wurde die HiTrap SP FF-Säule der Firma GE-Healthcare mit einem Bettvolumen von 1 ml verwendet, indem die geladene  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ -Gruppe an Agarose gekoppelt war. Efg1p als stark basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 9,6 wurde im Stamm HLCPEFG1 in SCAA-Medium überexprimiert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 13 000 Upm wurde der Überstand auf pH 8,0 mit 1 M NaOH eingestellt. Die Säule wurde vor dem Beladen mit 5 ml Äquilibrierungspuffer (50 mM HEPES pH 8,0; 1 % Triton x 100; 5 mM EDTA; 1 M NaCl) äquilibriert und anschließend mit 10 ml Waschpuffer (50 mM HEPES pH 8,0; 1 % Triton x 100; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl) gewaschen. Nach dem Durchfluss des Rohextraktes in einer Geschwindigkeit von 1 ml/min wurde die Säule mit 5fachem Bettvolumen Waschpuffer gewaschen. Für die anschließende Eluierung wurde ein Stufengradient verwendet. Es wurden die Konzentrationsabstände 200, 300, 400, 500, 700 und 1000 mM NaCl in 50mM HEPES pH 8,0; 1 % Triton x 100; 5 mM EDTA, gewählt. Es wurde in 1 ml Schritten eluiert.

### 2.7.17 Heparin-Säule

Mit einer Heparin-Säule lassen sich DNA-bindende Proteine aufreinigen. Efg1p wurde in 1 l SCAA-Medium überexprimiert und nach Kapitel 2.7.1 präpariert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 13 000 Upm wurde der Überstand auf pH 8,0 mit 1 M NaOH eingestellt. Der Überstand wurde mit einer maximalen Proteinkonzentration von 10 mg/ml auf die mit Lysepuffer (50 mM HEPES pH 8,0; 1 % Triton x 100; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA) äquilibrierte Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit dem 10fachen Bettvolumen Lysepuffer gewaschen. Eluiert wurde mit einem Elutionspuffer (50 mM HEPES pH 8,0; 1 % Triton x 100; 1 M NaCl; 5 mM EDTA) in 1 ml Schritten. Alle Aufreinigungsschritte fanden bei 4 °C statt.

### 2.7.18 Affigel-Blue-Säule

In einer mit Glaswolle gefüllten blauen Pipettenspitze wurde die Affigel-Blue Matrix pipettiert. Das Bettvolumen umfasste ungefähr 1 ml. Der Rohextrakt (Kapitel 2.7.1) wurde nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 13 000 Upm auf die Säule beladen und mit 5 ml Waschpuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 1 % Triton x 100; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurde mit 5 ml Elutionspuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 1 % Triton x 100; 1 M NaCl; 5 mM EDTA) eluiert.

### 2.7.19 Gelretardierungsexperimente

Mit Hilfe eines Gelretardierungsexperimentes lassen sich Interaktionen zwischen Proteinen und spezifischen DNA-Sequenzen nachweisen. Potenzielle Zielsequenzen wurden durch Restriktionshydrolyse aus einem Plasmid herausgeschnitten oder bei kurzen Sequenzen Primer verwendet. Diese Sequenzen wurden mittels T4-Polynukleotidkinase und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP radioaktiv markiert. Der Bindungsansatz von 20  $\mu$ l enthielt in der Regel 2  $\mu$ l 10 x Bindungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 500 mM KCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM EDTA; 50 % Glycerin), 2  $\mu$ l radioaktiv markierte DNA, 2  $\mu$ g Poly(dI-dC) (1 mg/ml), 1  $\mu$ l 20 mM DTT und verschiedene Protein Konzentrationen des Efg1-GST Proteins. Der Bindungsansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert, mit 2  $\mu$ l Ladepuffer (0,1 % w/v Xylencyanol-Lösung in dH<sub>2</sub>O) versetzt und auf ein 8 %iges, natives Polyacrylamidgel (13,3 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid; 150  $\mu$ l 20 % APS; 75  $\mu$ l TEMED; 2,5 ml 10 x TBE; mit Wasser ad 50 ml) geladen. Das Gel wurde vorher für 20 min bei 150 V vorlaufen gelassen. Als Laufpuffer diente 0,5 %iger TBE Puffer.

Die Elektrophorese wurde bei 150 V für ca. 3- 4 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier für mind. zwei Stunden bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Die Detektion erfolgte über Autoradiographie bei -70 °C.

## 2.8 2-D-Gelelektrophorese

Proteine lassen sich durch 2-D-Gelelektrophorese trennen. Mit dieser Methode werden die Proteine erst nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) und anschließend mittels einer SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die daraus resultierenden „Spots“, lassen sich massenspektroskopisch einem spezifischen Protein zuordnen.

### 2.8.1 Probenvorbereitung

Um eine Auftrennung in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zu erzielen, sollte die zu trennende Proteinsuspension von überflüssigen Salzen getrennt werden. Aus diesem Grund wurden die Rohextrakte wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben isoliert und anschließend jeweils 500 µg Protein mit Aceton gefällt. Für die Fällung wurden drei Volumen des Rohextraktes eiskaltes Aceton p.A. hinzugefügt und für 2 h bei -20 °C gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation für 30 min bei 13.000 Upm (4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet, um Acetonreste zu entfernen. Das Pellet wurde für die isoelektrischen Fokussierung in einem Streifenhalter in 350 µl Rehydratisierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2,5 % DTT, 10 % Isopropanol, 5 % Glycerol, 2 % IPG-Puffer) aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Für die „Cup-Loading Methode“ wurden die Pellets in 100 µl Rehydratisierungspuffer aufgenommen und wie oben beschrieben behandelt.

### 2.8.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

#### 2.8.2.1 IEF in einem IPG Streifenhalter

Für die erste Dimension wurden 18 cm IPG (Immobilisierter-pH-Gradient)-Streifen (pH 6-11) von Amersham verwendet. Die Proteinprobe wurde in die zugehörigen Keramikhalter pipettiert. Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten in die Keramikhalterung gelegt. Um eine gleichmäßige Auftrennung zu ermöglichen, sollte die Probe gleichmäßig und luftblasenfrei unter dem IPG-Streifen verteilt sein. Der Streifen wurden über die gesamte Länge mit 1 ml IPG Cover Fluid (Amersham) überschichtet, um eine Kristallisation des Harnstoffes zu vermeiden. Die anschließende isoelektrische Fokussierung erfolgte in der IPGphor Apparatur von Amersham mit 50.000 V über Nacht.

#### 2.8.2.2 Cup-Loading

Eine andere Methode der Probenbeladung stellt die Cup-Loading Technik dar. Diese Technik beruht darauf, dass die Probe nicht auf die gesamte Streifen Oberfläche geladen wird, sondern auf eine bestimmte Stelle konzentriert geladen wird.

Für diese Technik wurde ein 18 cm IPG-Streifen über Nacht in einem Keramikhalter in 340 µl Rehydratisierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde der Streifen in die vorgesehene Cup-Loading Halterung überführt, wobei in diesem Fall die Gelseite nach oben gelegt wurde. Im Anschluss folgte eine Überschichtung mit 3-5 ml Cover Fluid. An die Enden der Streifen wurde ein 0,5 x 0,5 cm Filterpapier Stück gelegt und diese mit den Elektroden festgedrückt, um einen Kontakt zwischen Gel und Elektrode zu gewährleisten. Die Probe wurde mittels eines

Probenbechers an eine bestimmte Stelle beladen. Die IEF erfolgte in der IPGphor Apparatur bei 50.000 V über Nacht.

### 2.8.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Streifen wurden für die zweite Dimension zunächst in 10 ml Equilibrierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 2 % SDS, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, Bromphenolblau) mit 1 % DTT unter leichtem Schütteln 15 min inkubiert. Anschließend wird die Lösung verworfen und der Streifen mit 10 Equilibrierungspuffer mit 2,5 % Jodacetamid erneut unter leichtem Schütteln 15 min inkubiert.

Abweichend von den üblichen SDS-Gelen benötigt man für die zweite Dimension nur ein 8 %iges Trenngel. Dieses wurde nach Kapitel 2.7.6 hergestellt. Das Trenngel wurde bis 1,5 cm vor Ende der Glasplatten gegossen. Die Streifen wurden über dem Trenngel mit Agarose-Dichtungslösung (0,5 % Agarose NA, 0,002 % Bromphenolblau in Laufpuffer) fixiert und die Proteine für 3 h bei 120 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente der SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 (vorgefärbt) Marker. Dieser wurde vorher auf ein 0,5 x 0,5 cm Filterquadrat aufpipettiert und wie der IPG-Streifen auf dem Trenngel fixiert. Zur Visualisierung der Proteine wurden die Gele entweder durch Immunoblot analysiert oder mit Coomassie R 250 oder Silbernitrat angefärbt.

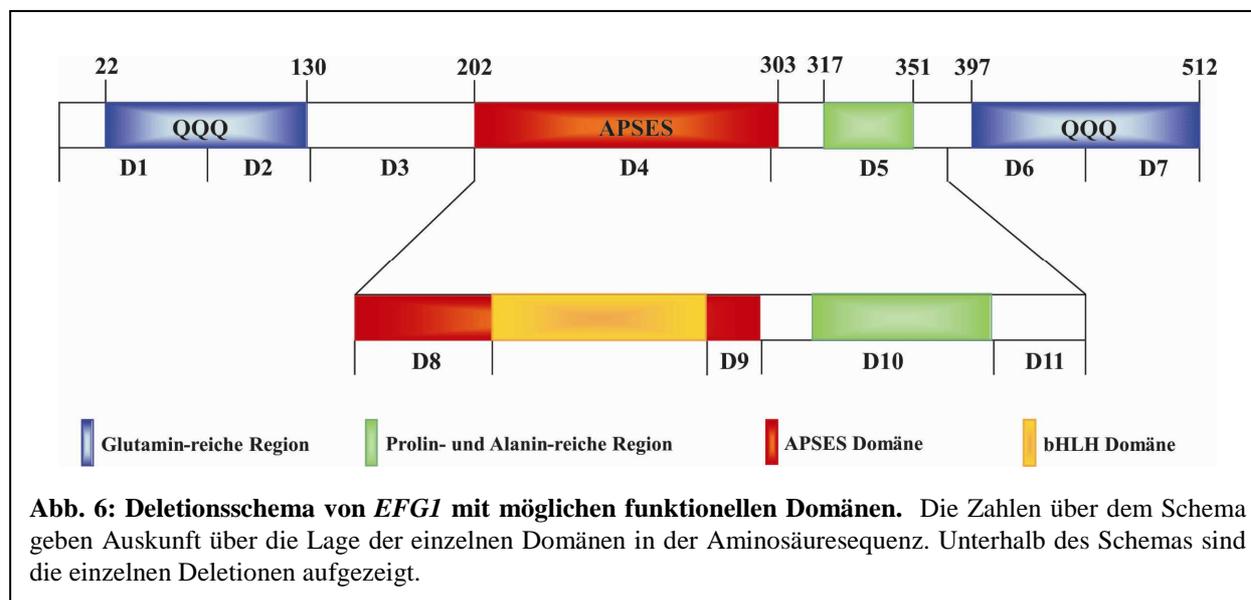
### 3 Ergebnisse

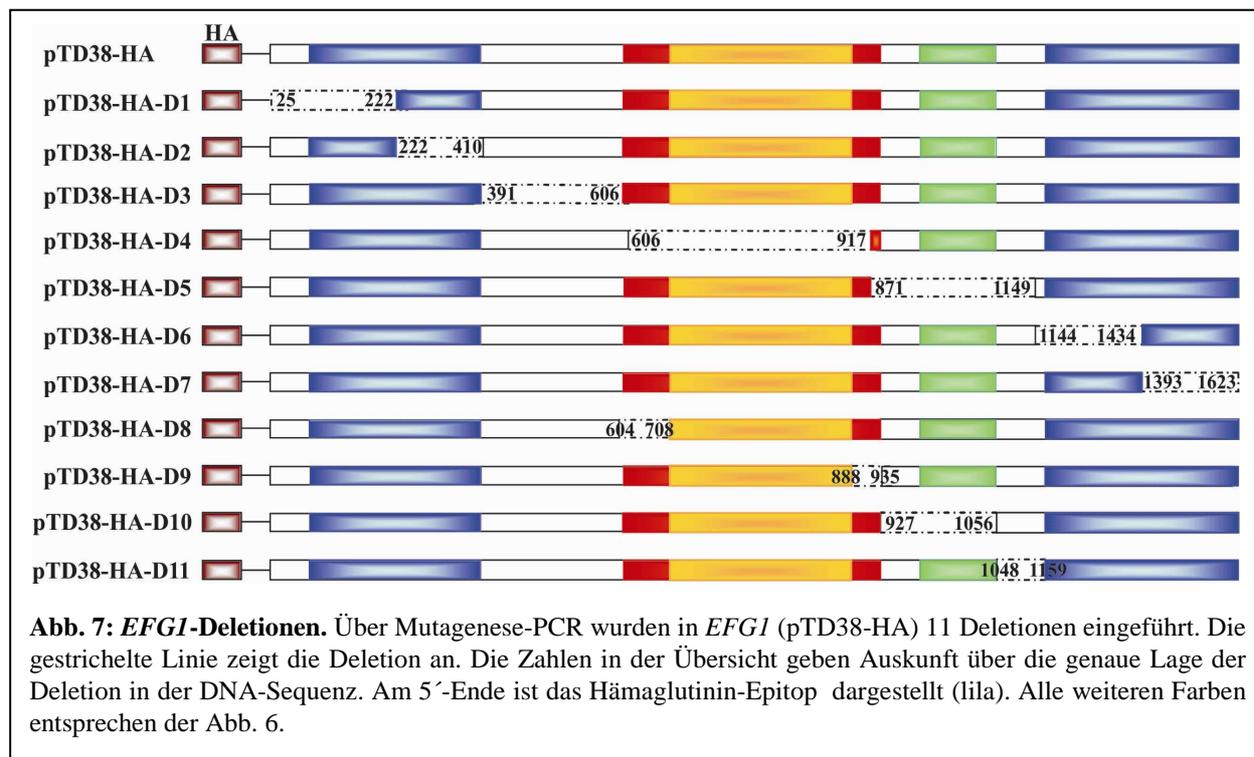
#### 3.1 Funktions-Analyse des Transkriptionsfaktors Efg1p

Der Transkriptionsfaktor Efg1p gehört zu den APSES Proteinen und stellt ein Schlüsselprotein der Morphogenese in *C. albicans* dar. So sind *efg1*-Mutanten unter den meisten hypheninduzierenden Bedingungen afilamentös (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Efg1p ist außerdem an weiteren morphogenetischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel an der Chlamydosporenbildung (Sonneborn *et al.*, 1999a) oder auch an dem spontanen Phänotypwechsel zwischen *opaque*- und *white*-Zellen (Sonneborn *et al.*, 1999b). Bislang ist nur wenig über Struktur-Funktionskennzeichnungen des Efg1p bekannt; lediglich eine Phosphorylierungsstelle durch die Proteinkinase A am Threonin 206 in der APSES-Domäne konnte identifiziert werden (Bockmühl und Ernst, 2001). In diesem Teil der Arbeit sollte das Efg1-Protein auf funktionelle Domänen untersucht werden.

##### 3.1.1 Systematische Deletionen des Efg1p Proteins

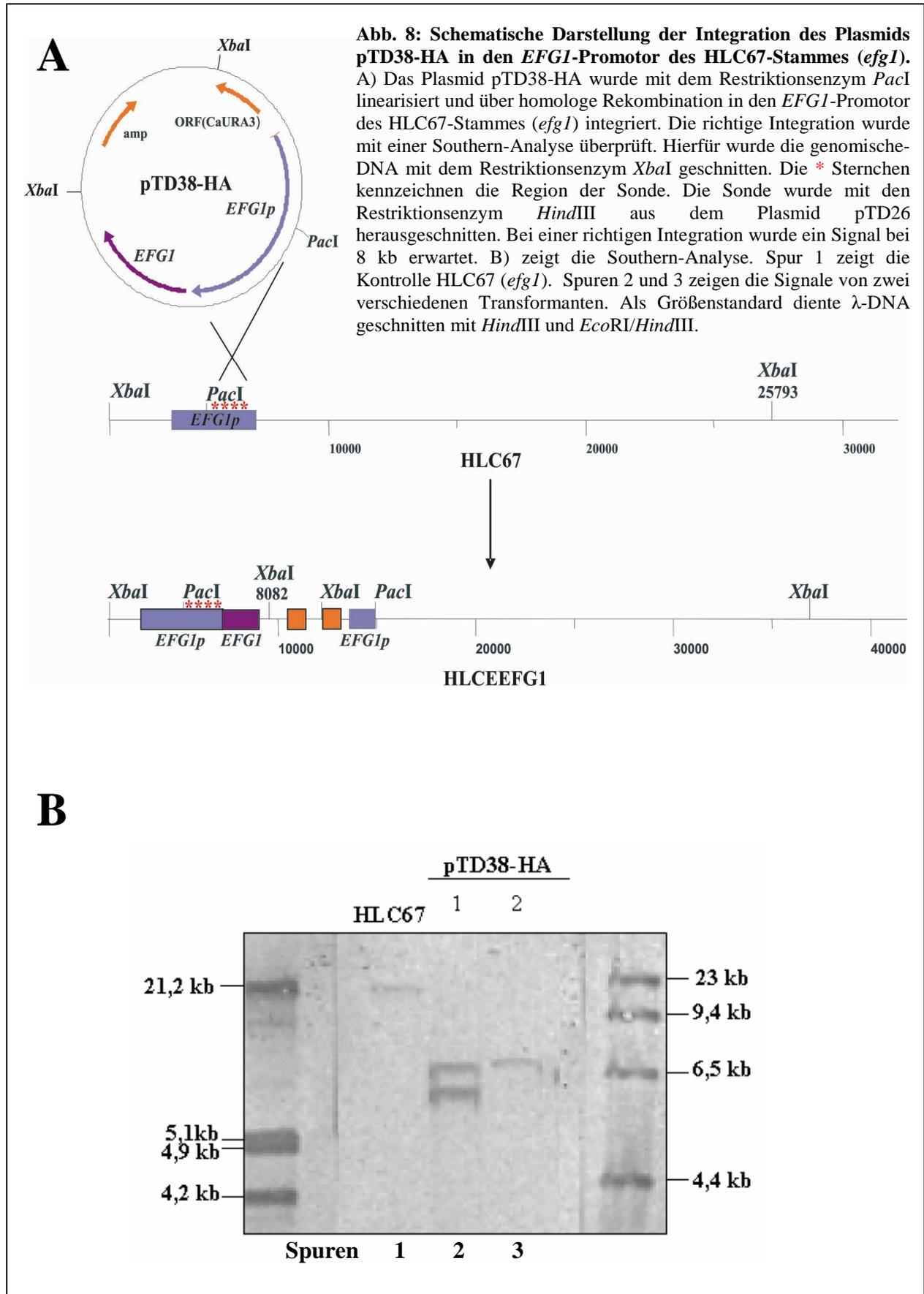
Mit Hilfe des Prosite Programms von ExPASy <http://www.expasy.org/prosite/> wurde nach möglichen funktionellen Motiven im Efg1-Protein gesucht. Dieses Programm vergleicht Proteinsequenzen mit bekannten Proteindomänen. Durch diese Datenbank-Analyse konnten vier Domänen gefunden werden. Zwei dieser Domänen konnten am N- und C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert und als Glutamin-reiche Regionen spezifiziert werden. Diese möglichen Domänen liegen in der Aminosäuresequenz zwischen Position 22-130 und 397-512. Eine kleine Domäne zwischen Position 317 – 351 in der Aminosäuresequenz wurde als Alanin- und Prolin-reiche Region (low complexity region) erkannt. Im zentralen Bereich des Efg1-Proteins befindet sich die APSES-Domäne mit einem zentralen bHLH-Motiv (Abb. 6). Um diese möglichen funktionellen Domänen des Efg1p-Proteins zu untersuchen, wurden über Mutagenese-PCR im *EFG1*-Gen systematisch je eine von elf Deletionen eingeführt (Abb. 7).





Als Ausgangsplasmid diente pTD38-HA, welches ein *EFG1*-Gen (*HA-EFG1*) enthält, das für ein Hämagglutinin-Epitop (HA) markiertes Efg1p kodiert. In Abb. 7 sind die elf Deletionen schematisch aufgeführt. Alle elf Deletionsplasmide von pTD38-HA-D1 bis D11, sowie die Positivkontrolle pTD38-HA und die Negativkontrolle pTD38 ohne *EFG1* (nur mit *EFG1*-Promotor), wurden im *EFG1*-Promotor mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert und über homologe Rekombination in den *EFG1*-Promotor der *efg1*-Mutante (HLC67) integriert (Abb. 8). Die richtige Integration wurde mit Hilfe einer Southern Analyse überprüft. Für diese Analyse wurde die genomische-DNA der Transformanten mit dem Restriktionsenzym *XbaI* geschnitten und mit einer Sonde analysiert. Als Sonde diente ein 1,2 kb *EFG1*-Promotorfragment aus dem Plasmid pTD26, welches mit den Restriktionsenzymen *HindIII* ausgeschnitten wurde. Bei einer richtigen Integration wurde ein Signal bei 8 kb erwartet. Als Kontrolle diente die genomische-DNA der *efg1*-Mutante (HLC67), mit einem Signal bei ca. 26 kb. In Abb. 8 B ist exemplarisch ein Southern-Analyse gezeigt. Spur 1 zeigt die *efg1*-Mutante (HLC67) mit einem Signal bei ca. 26 kb. Spuren 2 und 3 zeigen exemplarisch zwei Transformanten der pTD38-HA-Integration (Positivkontrolle). Es ist zu erkennen, dass die Transformante in Spur 2 eine Fehlintegration aufweist, während die zweite Transformante nur ein Signal bei 8 kb zeigt, die bei einer richtigen Integration erwartet wurde.

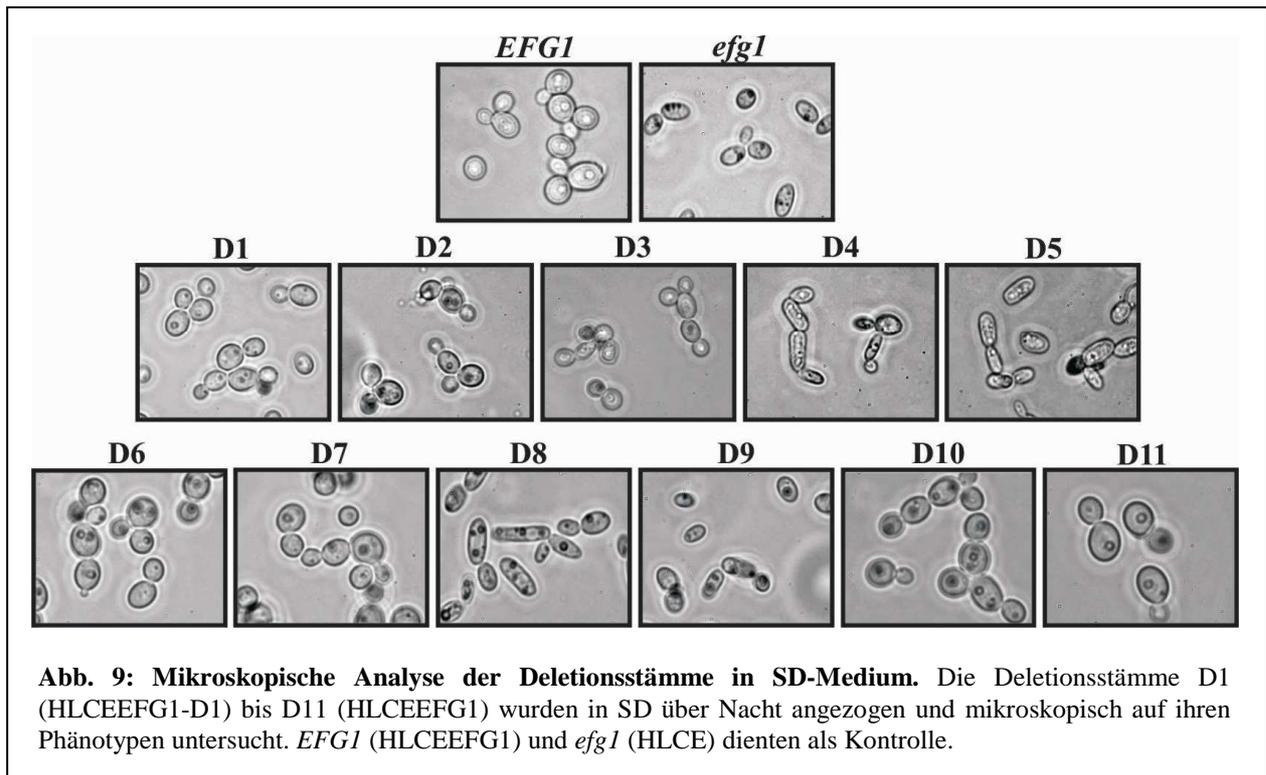
Die richtigen Deletionsstämme wurden HLCEEFG1-D1 (D1) bis HLCEEFG1-D11 (D11), die Positivkontrolle HLCEEFG1 (*EFG1*) und die Negativkontrolle HLCE (*efg1*) genannt (siehe Tabelle in 2.2.2).



### 3.1.2 Morphologie der Deletionsstämme

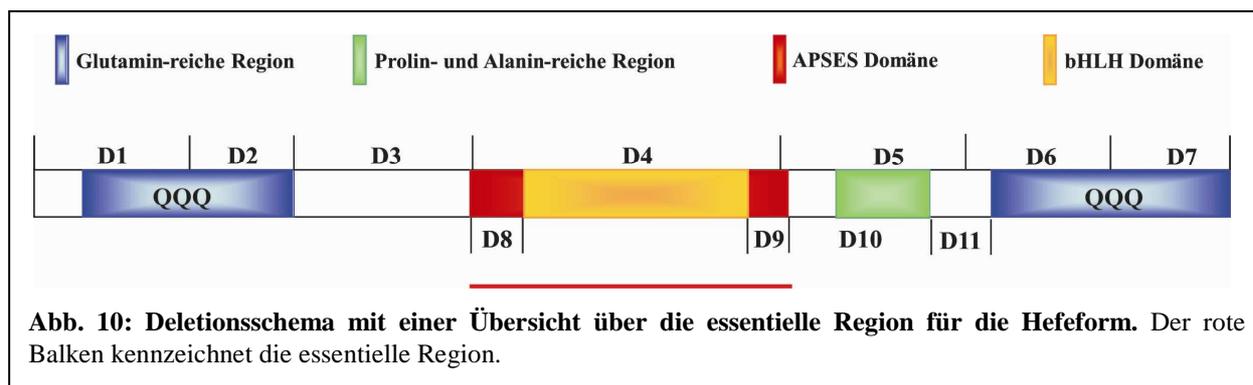
*efg1*-Mutanten zeigen einen veränderten Hefe-Phänotyp und bilden im Gegensatz zu den kugeligen Hefezellen länglich ovale Zellen, die der „Opaque“-Zellform ähneln (Stoldt *et al.*, 1997; Doedt, 2004).

Um zu untersuchen, ob sich die Hefeform der Deletionsstämme von der normalen Hefeform unterscheidet, wurden die Deletionsstämme über Nacht in SD-Medium angezogen und die Morphologie mikroskopisch untersucht. Als Kontrollstämme dienten HLCEEFG1 (*EFG1*) und HLCE (*efg1*).



**Abb. 9: Mikroskopische Analyse der Deletionsstämme in SD-Medium.** Die Deletionsstämme D1 (HLCEEFG1-D1) bis D11 (HLCEEFG1) wurden in SD über Nacht angezogen und mikroskopisch auf ihren Phänotypen untersucht. *EFG1* (HLCEEFG1) und *efg1* (HLCE) dienten als Kontrolle.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 9 zeigen die Zellformen der einzelnen Deletionsstämme; in der oberen Reihe ist die Positivkontrolle (*EFG1*) und die Negativkontrolle (*efg1*) zu sehen. Wie zu erwarten bildet der *EFG1*-Stamm kugelige Hefezellen, die bei der *efg1*-Mutante schmaler und aus diesem Grund optisch etwas kleiner aussehen. Dieser schmale, Stäbchen-förmige Phänotyp ist ebenfalls bei den Deletionen D4, D5, D8 und D9 wieder zu finden. Die restlichen Deletionsstämme verhalten sich entsprechend der *EFG1*-Kontrolle. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass für die Ausbildung der normalen Hefeform die APSES-Domäne mit ihrem bHLH-Motiv eine entscheidende Rolle spielt. Auch Deletion D5, welche nur 13 Aminosäuren C-Terminal von der APSES-Domäne beinhaltet, zeigt einen abnormalen Hefe-Phänotyp. Da jedoch die Deletionsstämme D10 und D11, die in der Deletion D5 enthalten sind, einen Wildtyp-ähnlichen Phänotypen zeigen, kann man davon ausgehen, dass die defekte Morphologie bei Deletion D5 vom Fehlen der APSES-Domäne herrührt. Daraus wird deutlich, dass die APSES-Domäne eine wichtige Funktion für die Morphologie der Hefezelle ausübt.



### 3.1.3 Einfluss der Deletionen auf die Hyphenbildung

Efg1p ist unter den meisten Bedingungen für die Bildung der Hyphen essentiell und damit ein wichtiger Faktor für die Virulenz von *C. albicans* (Lo *et al.*, 1997). Aus diesem Grund war von großem Interesse, welche Deletionsvarianten die Hyphenbildung nicht mehr erlauben.

Jeweils drei Transformanten pro Deletionsstamm wurden auf festen Induktionsplatten vereinzelt. Diese Platten wurden für ein bis zwei Tage bei 37 °C inkubiert und auf ihre Hyphenbildung untersucht. Als Induktionsmedien wurden 5 % Serum-Platten und Lee's-Platten verwendet.

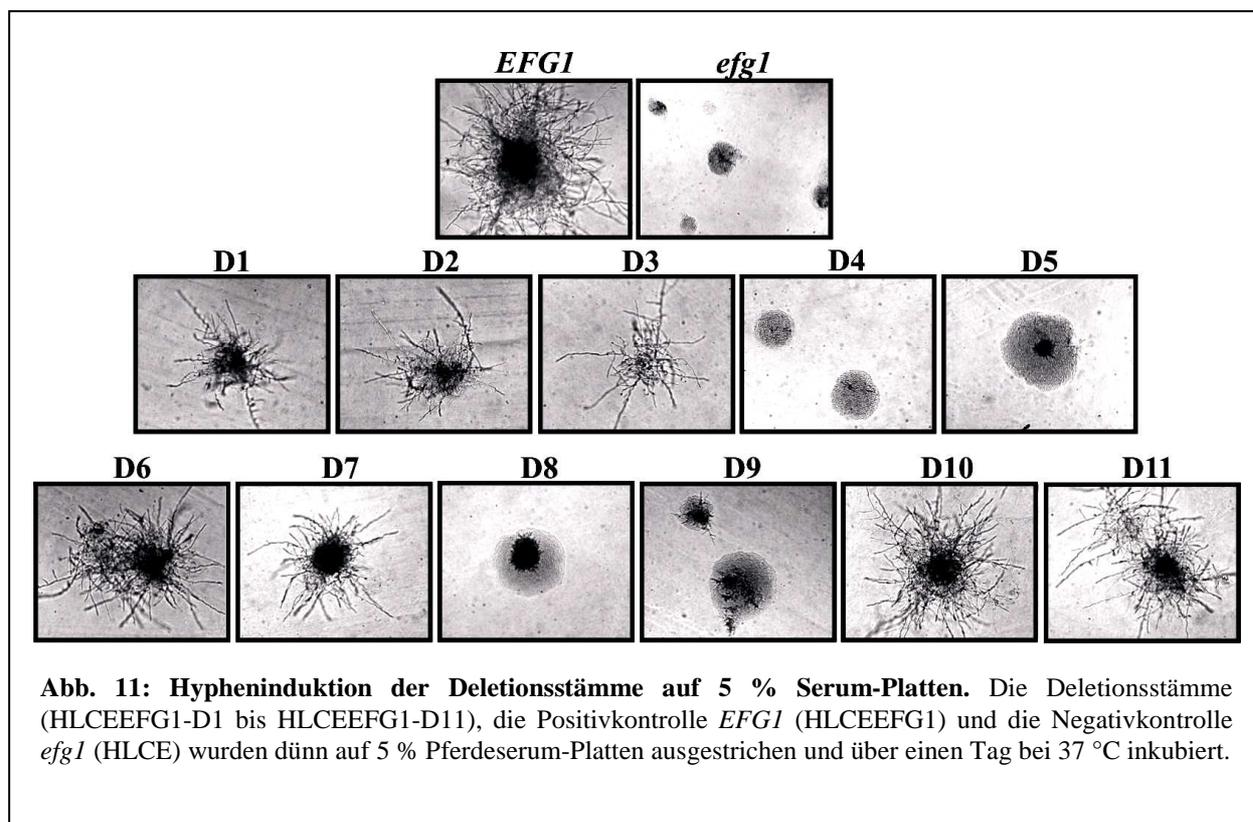
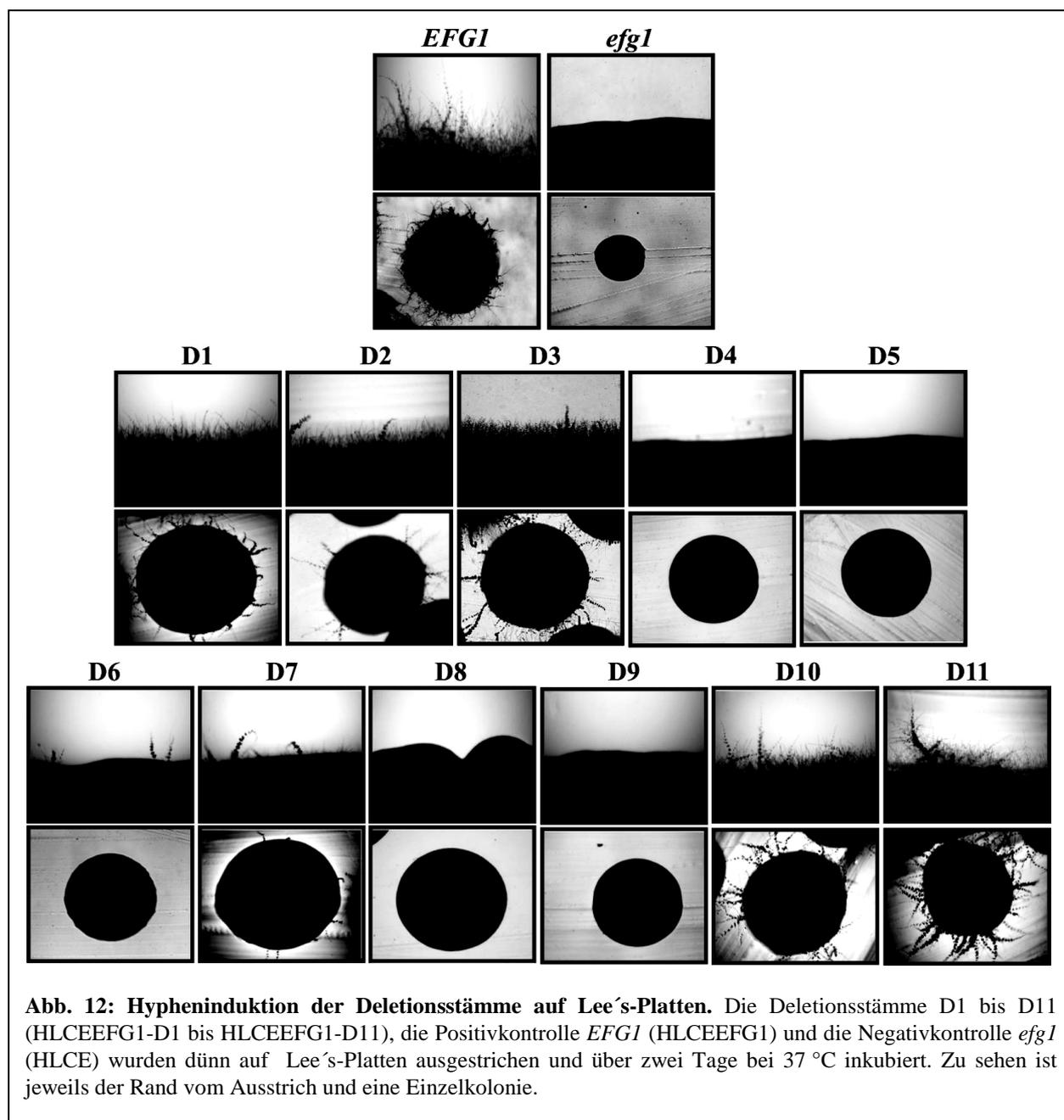


Abb. 11 zeigt die Kolonien auf 5 % Serum-Platten. Es ist zu sehen, dass sich die Deletionen D4, D5, D8 und D9 vergleichbar der *efg1*-Mutante verhalten und keine Hyphen bilden. Alle weiteren Deletionen können weiterhin Hyphen bilden und zeigen keinen Unterschied zum *EFG1*-Stamm.

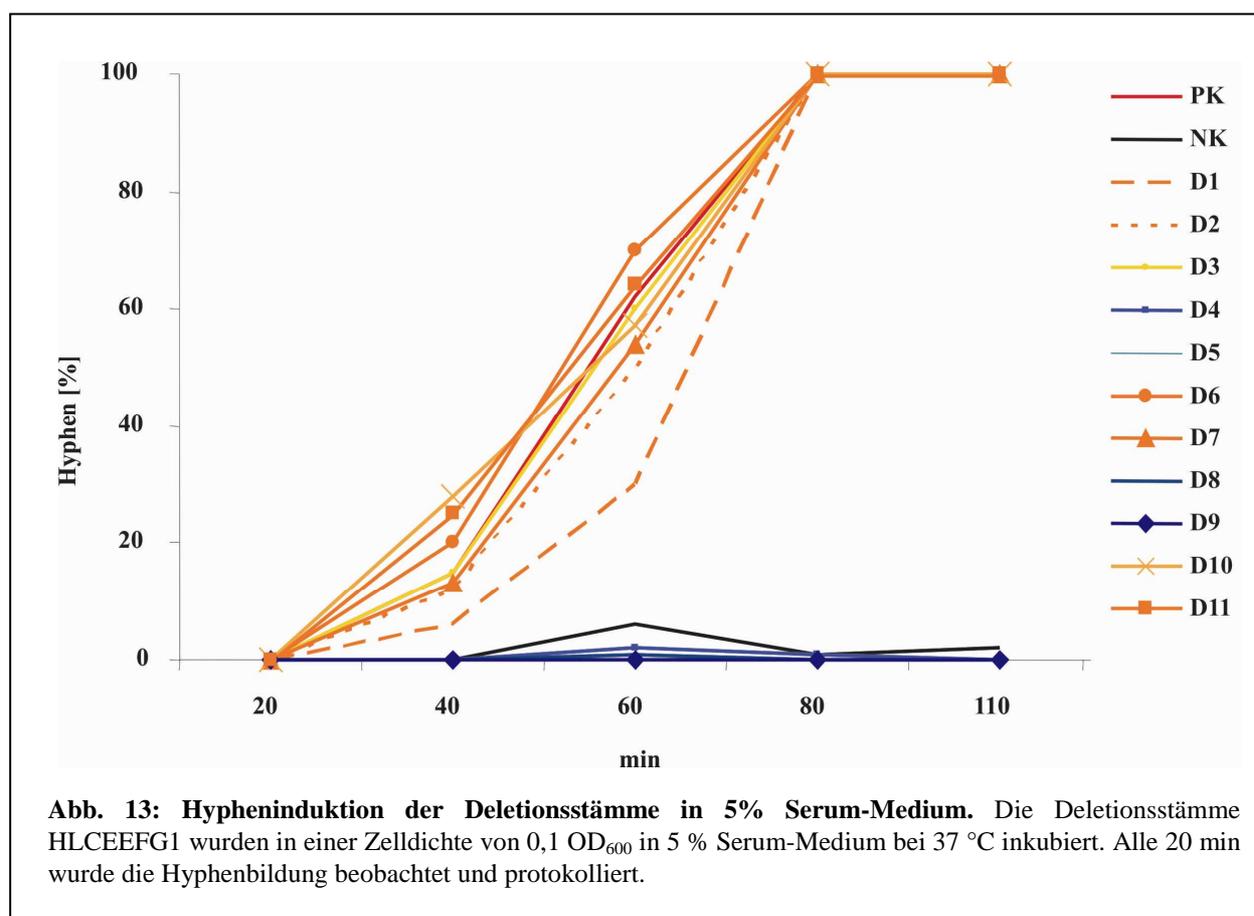
Um die Hyphenbildung auf weiteren Induktionsmedien zu testen, wurden die Stämme auf Lee´s-Platten vereinzelt (Abb. 12). Auch hier zeigte sich, dass nur die Deletionsstämme D4, D5, D8 und D9 sowohl am Ausstrich, als auch bei den Einzelkolonien keine Hyphen bilden. Die Deletionsstämme D1, D2, D3, D10 und D11 zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Positivkontrolle mit unverändertem *EFG1*-Gen. Die Hyphenbildung bei Stamm D7 ist im Vergleich zu den anderen Deletionsstämmen etwas verzögert. Während bei den meisten Deletionen über den Ausstrich verteilt Hyphen zu sehen sind, ist bei diesem Stamm lediglich vereinzelt filamentöses Wachstum zu erkennen; die Einzelkolonien verhalten sich jedoch ähnlich der Positivkontrolle (*EFG1*). Die Deletion D6 zeigt zum Zeitpunkt der Aufnahme lediglich am Ausstrich vereinzelt Hyphen, während die Einzelkolonien keine Hyphen gebildet haben. Dieses ist jedoch nur eine Verzögerung, da nach einem weiteren Tag auch diese ein filamentöses Wachstum zeigten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12: Hypheninduktion der Deletionsstämmen auf Lee's-Platten.** Die Deletionsstämmen D1 bis D11 (HLCEEFG1-D1 bis HLCEEFG1-D11), die Positivkontrolle *EFG1* (HLCEEFG1) und die Negativkontrolle *efg1* (HLCE) wurden dünn auf Lee's-Platten ausgestrichen und über zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Zu sehen ist jeweils der Rand vom Ausstrich und eine Einzelkolonie.

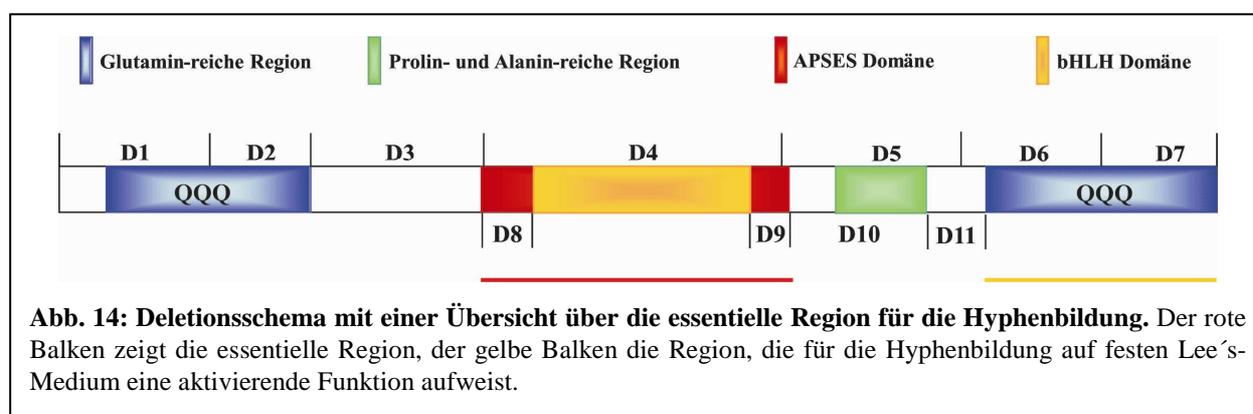
Tendenziell korrelieren diese Ergebnisse mit denen unter 3.1.2 beschriebenen Daten. So zeigen die Deletionsstämme mit einem Defekt in der Hefe-Morphologie ebenfalls einen Verlust in der Fähigkeit Hyphen zu bilden. Auch hier wurde beobachtet, dass die Deletion D5, die nur 13 Aminosäuren von der C-terminalen APSES-Domäne beinhaltet, einen Verlust der Hyphenbildung aufweist. Die Deletionen D10 und D11 hingegen, die in der Deletion D5 beinhaltet sind, können weiterhin Hyphen bilden. Dieses Ergebnis deutet erneut darauf hin, dass die APSES-Domäne eine wichtige Domäne des Efg1-Proteins ist und ein Fehlen von nur 13 Aminosäuren zu einem Verlust der Efg1p-Aktivität zur Folge hat. Die Stämme D6 und D7 weisen durch ihr verlangsamtes Hyphenwachstum auf Lee's-Platten auf eine aktivierende Funktion der C-terminalen Glutamin-reichen Domäne hin (Abb. 14).

Die Hypheninduktion auf festen Medien ist geeignet, um einen Überblick über die Tendenz der Hyphenbildung in den einzelnen Stämmen zu erhalten. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich, eine quantitative Aussage über die Hyphenbildung der einzelnen Stämme zu treffen, da die Zellen untereinander variieren und nur ganze Kolonien betrachtet werden. In flüssigen Induktionsmedien hingegen ist eine Quantifizierung der Hyphen möglich, da die Zellen in Induktionsmedium überführt werden und die Anzahl der Zellen, die Keimschläuche gebildet haben, gezählt werden kann. Zur Quantifizierung der Hyphen wurden die HLCEEFG1-Deletionsstämme über Nacht in SD-Medium angezogen und anschließend in Induktionsmedium inkubiert. Die Hyphenbildung wurde alle 20 min protokolliert, indem die Anzahl der Hyphen pro 100 Zellen ermittelt wurde.



Bei der Hypheninduktion der Deletionsstämme (Abb. 13) in 5 % Serum zeigte sich, dass die Stämme D4, D5, D8 und D9 (Kurven in blau) einen Defekt in ihrer Hyphenbildung zeigen, während die Stämme D2, D3, D6, D7, D10 und D11 (Kurven in orange und gelb) keinen

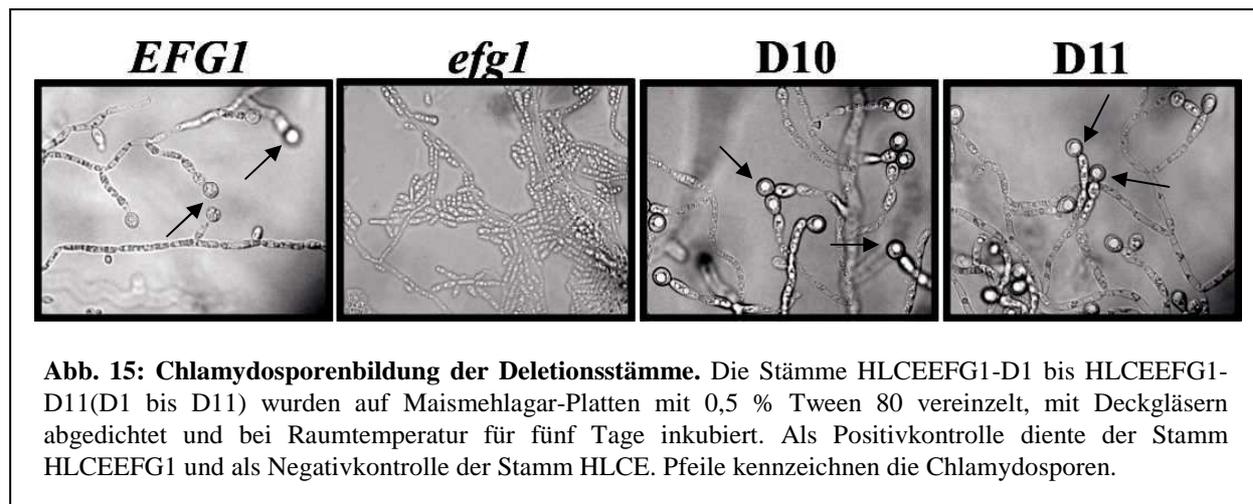
signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle *EFG1* (HLCEEFG1) aufweisen. Der D1-Stamm kennzeichnet sich durch eine leichte Verzögerung in der Hyphenbildung zwischen 40 min und 70 min. Nach 80 min sind jedoch, zeitgleich mit den anderen Stämmen, eine 100 %ige Hyphenbildung zu erkennen. Auch eine Hypheninduktion in Lee's-Flüssigmedium zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen in 5 % Serum-Flüssigmedium (Daten nicht gezeigt). Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse der Hypheninduktion in Flüssigmedium mit denen auf festen Platten ist eine Abweichung in den Stämmen D6 und D7 zu erkennen. Diese beiden Deletionen zeigen ein verlangsamtes Hyphenwachstum auf Lee's-Platten, die jedoch in flüssigen Induktionsmedien (5 % Serum und Lee's) und auf 5 % Serum-Platten nicht zu erkennen ist. Möglicherweise haben diese Regionen D6 und D7, welche die C-terminale Glutamin-reiche Domäne enthalten, eine aktivierende Funktion auf die Hyphenbildung bei einer Induktion auf festen Lee's-Medium, da auf 5 % Serum-Platten keine Verzögerung zu sehen ist. Insgesamt zeigt sich daher, dass für die Hypheninduktion auf festen Medien und in Flüssigmedium, die APSES-Domäne ein essentieller Faktor ist.



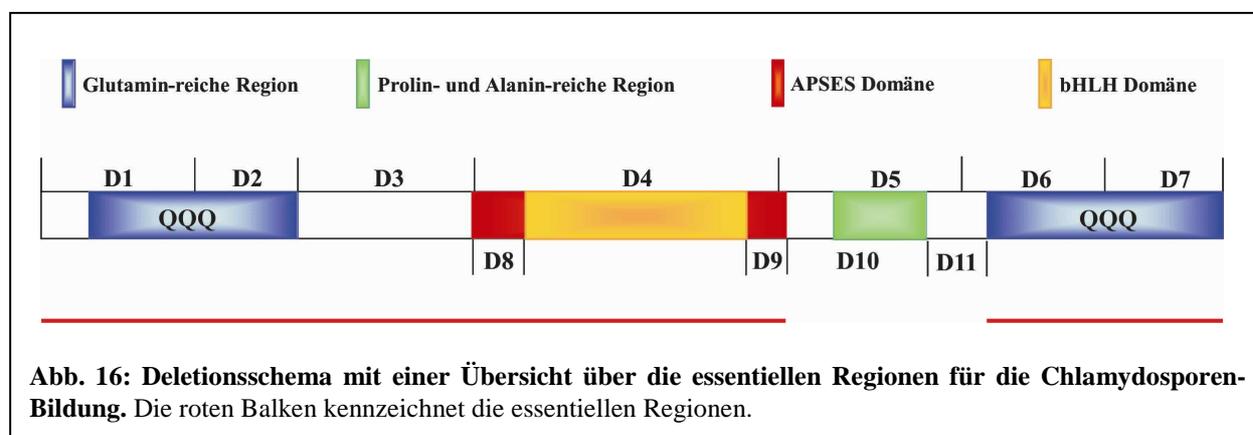
### 3.1.4 Chlamydosporenbildung der Deletionsstämmen

Neben der Hefe- und Hyphenform ist *C. albicans* in der Lage eine weitere Wachstumsform, die Chlamydosporen, zu bilden. Diese Sporen sind dickwandige kugelige Zellen, die an den Spitzen von Pseudohyphen oder Hyphen entstehen und durch eine mikroaerobe Umgebung ausgelöst werden. *efg1* Mutanten zeigen einen Verlust in der Chlamydosporenbildung (Sonneborn *et al.*, 1999a). Um zu zeigen, welchen Einfluss die verschiedenen Efg1-Varianten auf die Chlamydosporenbildung haben, wurden alle Deletionsstämmen auf Maismehlagar-Platten mit 0,5 % Tween 80 vereinzelt, mit sterilen Deckgläsern abgedichtet und bei RT für mindestens fünf Tage inkubiert.

Interessanterweise ist zu sehen, dass nur die Deletionsstämmen D10 und D11 fähig sind Chlamydosporen zu bilden (Abb. 15). Alle weiteren Deletionsstämmen zeigen wie die Negativkontrolle *efg1* filamentöses Wachstum, aber keine Chlamydosporen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Efg1p ein multifunktionelles Enzym ist, welches verschiedene Protein-Regionen zur Regulation von speziellen Wachstumsformen benötigt. Zur Induktion von Chlamydosporen benötigt Efg1p daher nicht nur die APSES-Domäne wie bei der Hefe- und Hyphen Morphogenese, sondern auch beide Glutamin-reichen Domänen, die an den terminalen Enden des Proteins lokalisiert sind (Abb. 16).



**Abb. 15: Chlamydosporenbildung der Deletionsstämmen.** Die Stämme HLCEEFG1-D1 bis HLCEEFG1-D11 (D1 bis D11) wurden auf Maismehlagar-Platten mit 0,5 % Tween 80 vereinzelt, mit Deckgläsern abgedichtet und bei Raumtemperatur für fünf Tage inkubiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm HLCEEFG1 und als Negativkontrolle der Stamm HLCE. Pfeile kennzeichnen die Chlamydosporen.



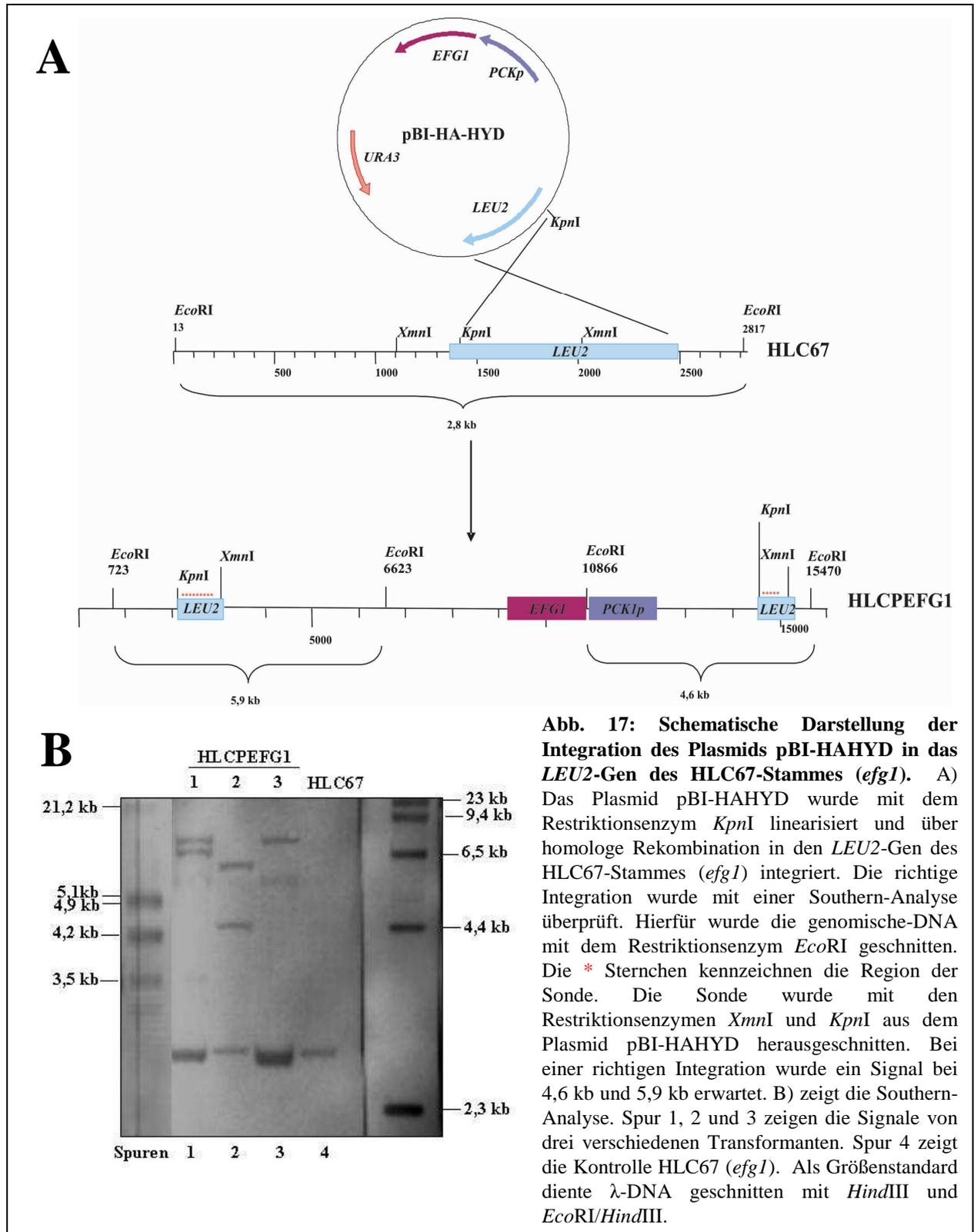
**Abb. 16: Deletionsschema mit einer Übersicht über die essentiellen Regionen für die Chlamydosporenbildung.** Die roten Balken kennzeichnen die essentiellen Regionen.

### 3.1.5 *EFG1*-Deletionen unter der Kontrolle des *PCK1p*-Promotor

Die bisherigen Versuche wurden mit Stämmen durchgeführt, bei dem das *EFG1*-Gen und seine Deletionsvarianten unter der Kontrolle des eigenen Promotors stehen. Dieser Promotor ist jedoch unter Laborbedingungen nicht regulierbar, so dass dieser für weitere Versuche, die eine Überexpression des *EFG1*-Gens benötigen oder die eine Regulierbarkeit des Promotors erfordern, nicht einsetzbar ist. Aus diesem Grund wurden alle Deletionen unter die Kontrolle des *PCK1*-Promotors gesetzt, der durch glukosehaltige Medien (SD) reprimiert und in glukosefreien Medien (SCAA) aktiviert wird.

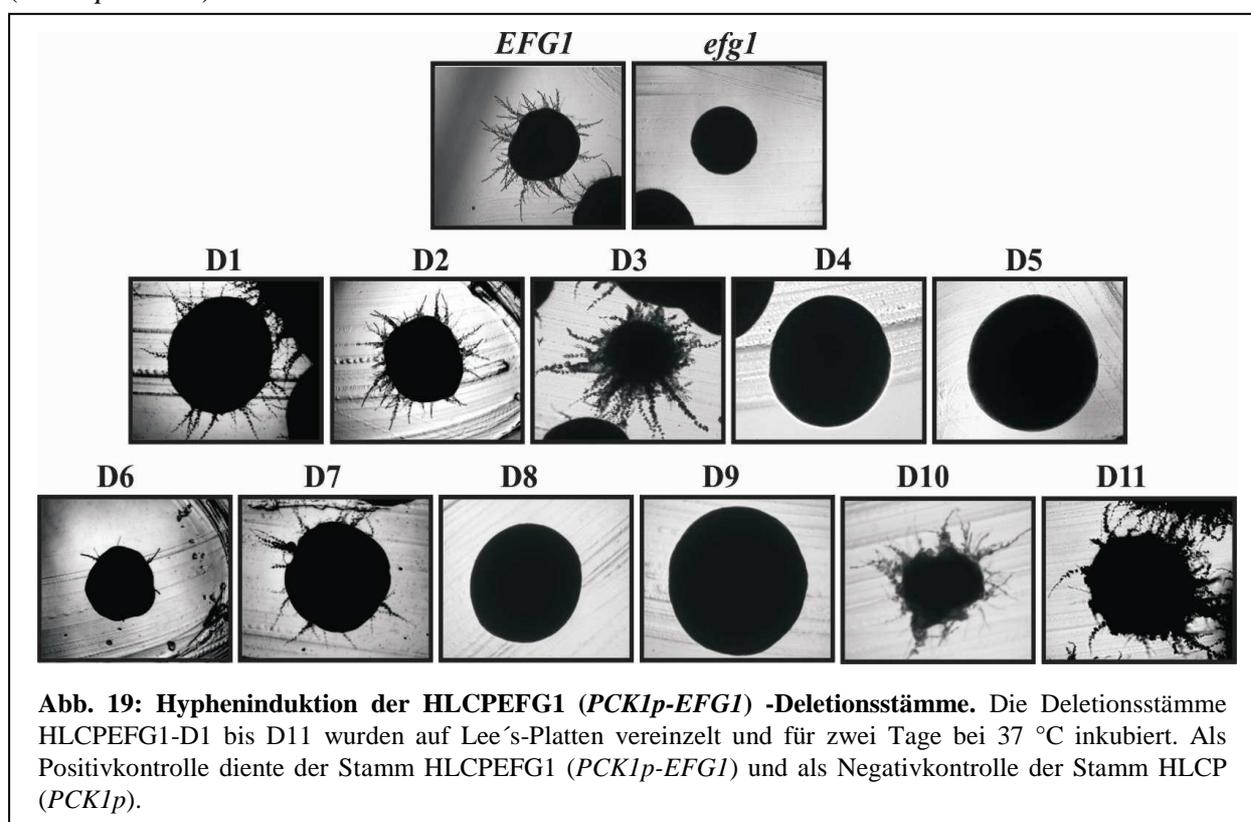
Um Expressionsvektoren zu konstruieren wurden die elf Deletionen mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese in das *EFG1*-Gen eingeführt (Abb. 7). Verwendet wurde hierbei das Plasmid pBI-HAHYD (*PCK1p*-HA-*EFG1*), welches eine Fusion von Efg1p an das Hämagglutinin-Epitop (HA) des Influenza-Virus unter der Regulation des *PCK1*-Promotors synthetisiert. Die entstandenen Plasmide pBI-HAHYD-D1 bis pBI-HAHYD-D11, sowie die Positivkontrolle pBI-HAHYD (*PCK1p*-HA-*EFG1*) und die Negativkontrolle pBI (*PCK1*-Promotor ohne *EFG1*), wurden mit *KpnI* im *LEU2*-Gen geschnitten und über homologe Rekombination in den *LEU2*-Genort der *efg1*-Mutante (HLC67) integriert (Abb. 17 A). Die richtige Integration wurde über Southern-Analyse verifiziert. Hierfür wurde die genomische-DNA der Transformanten mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und mit einer Sonde analysiert. Als Sonde diente ein 600 bp *LEU2*-Genfragment aus dem Plasmid pBI-HAHYD,

welches mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XmnI* ausgeschnitten wurde. Bei einer richtigen Integration wurden zwei Signale bei 4,6 kb und 5,9 kb erwartet. Als Kontrolle diente die genomische-DNA der *efg1*-Mutante (HLC67) mit einem Signal bei 2,8 kb. In Abb. 17 B ist exemplarisch ein Southern-Experiment gezeigt. Spur 1, 2 und 3 zeigen exemplarisch drei Transformanten der pBI-HAHDY-Integration (Positivkontrolle). Es ist zu sehen, dass die zweite

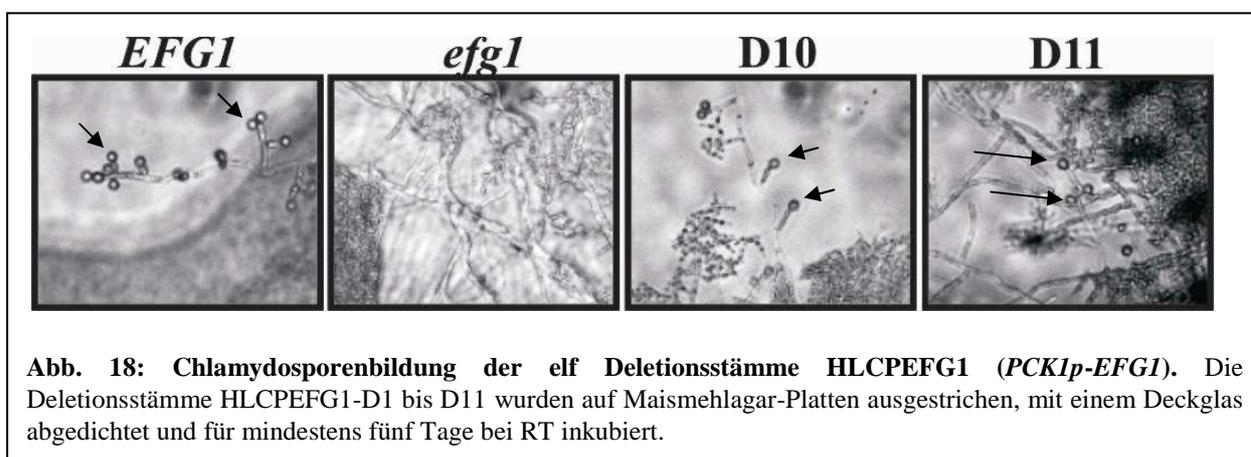


Transformante beide Signale (4,6 kb und 5,9 kb) aufweist, während die anderen Transformanten falsche Integrationen darstellen. Die Signale bei 2,8 kb werden durch das unveränderte *LEU2*-Allel hervorgerufen. In Spur 4 ist die Kontrolle HLC67 (*efg1*) zu sehen mit einem Signal bei 2,8 kb. Die elf richtigen Deletionsstämme wurden HLCPEFG1-D1 bis HLCPEFG1-D11, die Positivkontrolle HLCPEFG1 und die Negativkontrolle HLCP genannt.

Um sicherzustellen, dass der *PCK1*-Promotor keinen negativen Einfluss auf die Expression des *EFG1*-Gens ausübt, wurde zunächst überprüft, ob die Deletionsvarianten dieselben Eigenschaften aufweisen wie die Deletionen unter der Kontrolle des *EFG1*-Promotors. Dafür wurden diese Stämme auf Lee's-Platten vereinzelt und für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. In Abb. 19 ist zu sehen, dass nur die Deletionsvarianten D4, D5, D8 und D9 einen vollständigen Verlust der Hyphenbildung zeigen. Somit ist kein Unterschied der Hyphenbildung zwischen den Deletionsstämmen HLCPEFG1 (*EFG1p-EFG1*) und den Deletionsstämmen HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) zu erkennen.



**Abb. 19: Hypheninduktion der HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) -Deletionsstämme.** Die Deletionsstämme HLCPEFG1-D1 bis D11 wurden auf Lee's-Platten vereinzelt und für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) und als Negativkontrolle der Stamm HLCP (*PCK1p*).



**Abb. 18: Chlamydosporenbildung der elf Deletionsstämme HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*).** Die Deletionsstämme HLCPEFG1-D1 bis D11 wurden auf Maismehlagar-Platten ausgestrichen, mit einem Deckglas abgedichtet und für mindestens fünf Tage bei RT inkubiert.

Auch eine Induktion von Chlamydosporen der Deletionsvarianten HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) auf Maismehlagar-Platten für fünf Tage bei RT und Dunkelheit zeigte keine Unterschiede zu den Deletionsstämmen HLCEEFG1 (*EFG1p-EFG1*) (Abb. 18). Nur die Deletionen D10 und D11 wiesen Chlamydosporenbildung auf.

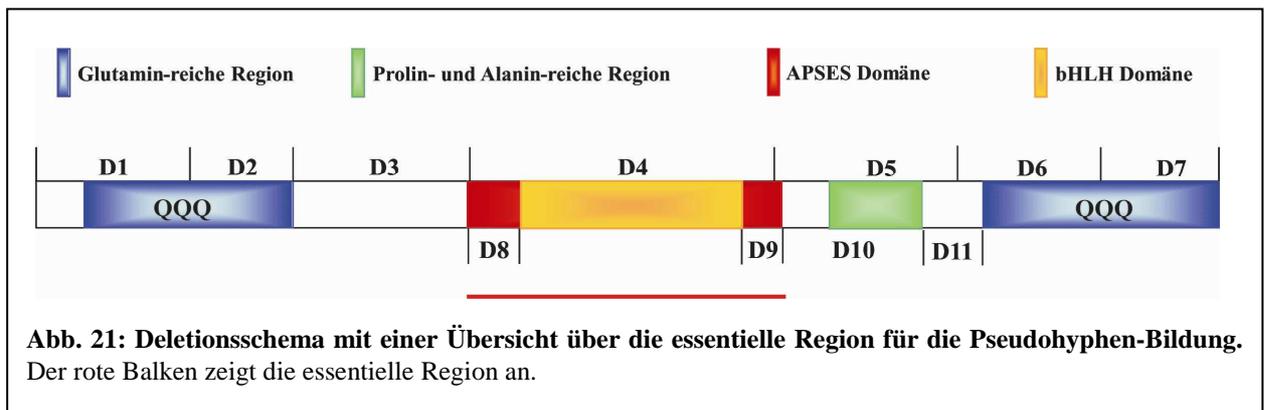
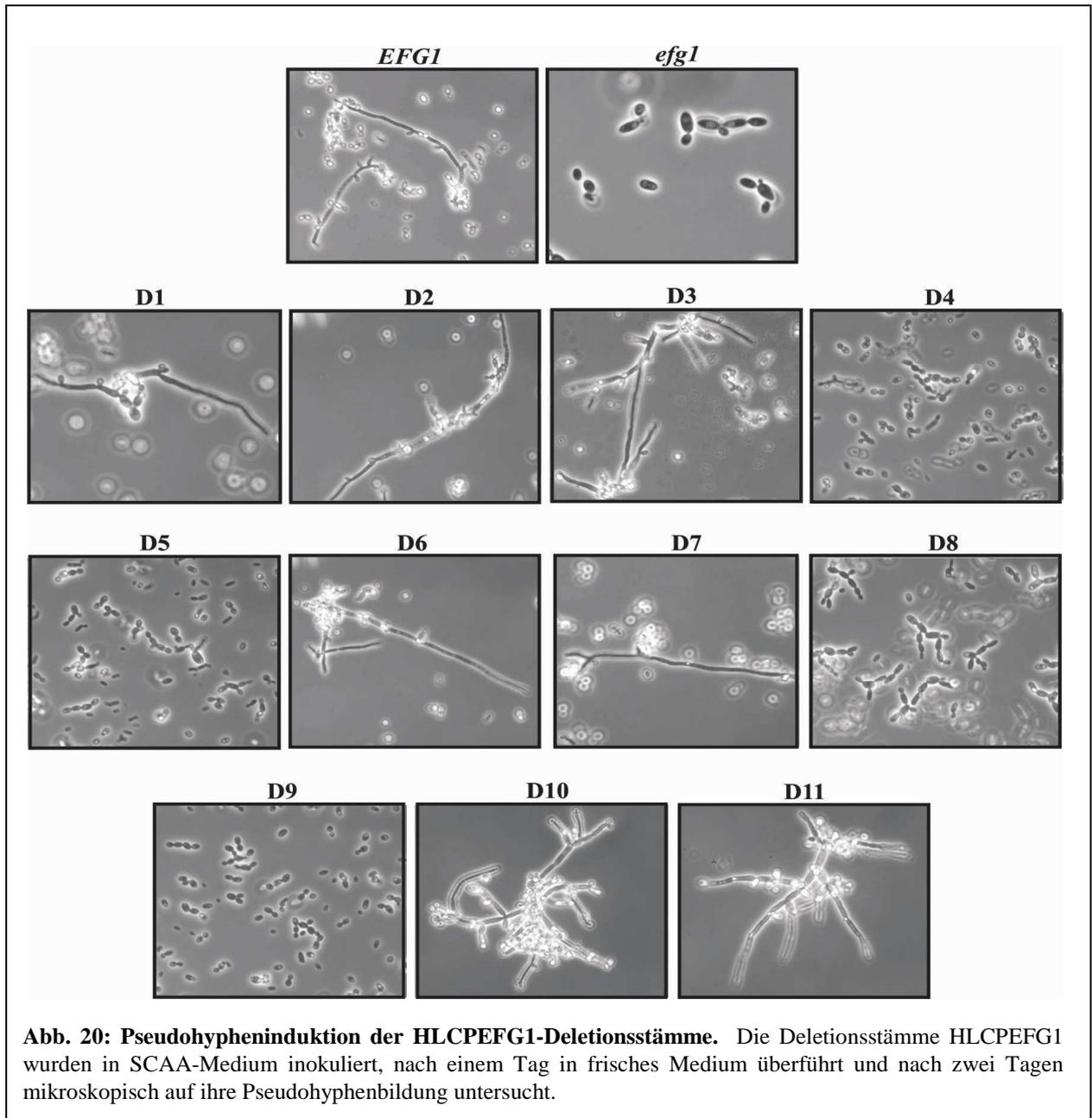
Somit kann ausgeschlossen werden, dass der *PCK1*-Promotor einen negativen Einfluss auf die Expression der Deletionen ausübt.

### 3.1.6 Überexpression der *EFG1* –Deletionsvarianten

Die Überexpression von *EFG1* induziert die Bildung von Pseudohyphen. Diese Zellen sind, im Gegensatz zu den echten Hyphen, eine andere Form des filamentösen Wachstums (Stoldt *et al.*, 1997). Echte Hyphen unterscheiden sich von den Pseudohyphen, da sie durch ein kontinuierliches apikales Wachstum einen Keimschlauch bilden, der durch Septen unterteilt ist. Im Gegensatz dazu sind Pseudohyphen stark elongierte Zellen, die durch unipolare Knospung entstanden sind. Diese Zellen erhalten die Verbindung zur Mutterzelle und bilden Zellketten.

Mit Hilfe der Deletionsstämmen sollte untersucht werden, welche Domänen im *Efg1p* für die Pseudohyphenbildung essentiell sind. Dafür wurden die einzelnen HLCPEFG1-Deletionsstämmen (*PCK1p-EFG1*) in SCAA-Medium überführt. Dieses Medium enthält keine Glukose, um den *PCK1*-Promotor zu induzieren. Nach einem Tag wurden die einzelnen Kulturen in frisches SCAA-Medium inokuliert und einen weiteren Tag bei 30 °C inkubiert. Nach zwei Induktionstagen wurde die Pseudohyphenbildung mikroskopisch untersucht.

Der Abb. 20 kann entnommen werden, dass die Deletionen D4, D5, D8 und D9 einen Defekt in der Pseudohyphenbildung zeigen. Auch hier wird erneut die wichtige Funktion von der APSES-Domäne deutlich, da die Deletion D5, die einen kleinen Teil der C-terminalen APSES-Domäne beinhaltet, wieder einen starken Defekt aufweist. Dieses Ergebnis beweist abermals, dass die APSES-Domäne eine wichtige Funktion hat und auch für die Bildung von Pseudohyphen essentiell ist (Abb. 21).



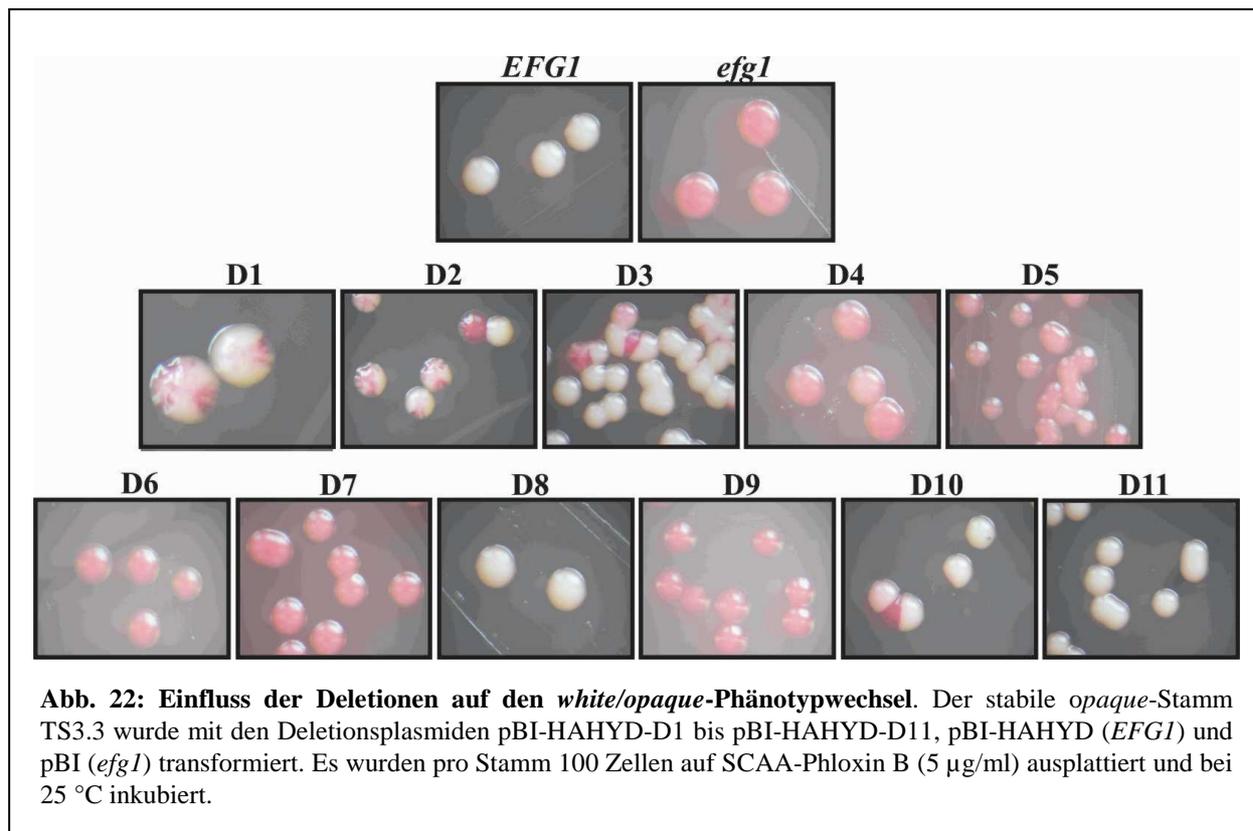
### 3.1.7 Untersuchung der *EFG1*-Deletionen auf ein dominantes Verhalten

Bei manchen mutanten Allelen konnte gezeigt werden, dass diese ein dominant-negatives Verhalten zeigen (Feng *et al.*, 1999). Dasselbe wurde für die *EFG1*-Deletionsvarianten vermutet. Um dieses zu überprüfen wurden alle pBI-HAHYD-Deletionen mit dem Restriktionsenzym *KpnI* im *LEU2*-Gen geschnitten und über homologe Rekombination in den *LEU2*-Lokus des CAI4-Stammes (*EFG1/EFG1*) integriert. Die richtige Integration wurde über Southern-Analyse kontrolliert. Jeweils drei Transformanten wurden auf 5 % Serum-Platten ausgestrichen und auf ihre Hyphenbildung untersucht. Alle Stämme verhielten sich ähnlich der Kontrolle CAI4 (Daten nicht gezeigt). Es konnte daher kein dominantes Verhalten der deletierten *EFG1*-Allele gegenüber dem intakten *EFG1*-Allel beobachtet werden.

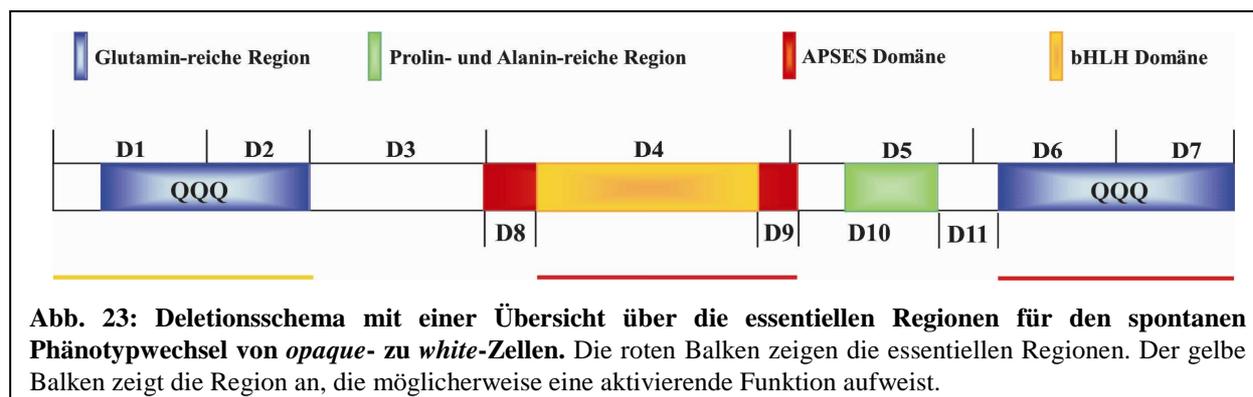
### 3.1.8 *opaque* – *white*-Phänotypwechsel

Das *white/opaque*-„Switching“ ist neben dem Dimorphismus eine weitere Form des reversiblen Wechsels zwischen zwei verschiedenen Wachstumsformen, die ebenfalls wichtig für die Pathogenese von *C. albicans* ist und eine Funktion beim Paarungsprozess hat (Zordan *et al.*, 2006). Der *white*-Phänotyp zeichnet sich durch eine rundliche bis ovale Zellform aus, der von 25 °C bis 30 °C beständig ist. Die Kolonien dieser Zellen sind weiß und leicht erhoben. Die *opaque*-Zellen hingegen sind elongierte bis stäbchenförmige Zellen die eine relativ glatte gräuliche Kolonie bilden. Diese Zellen sind ausschließlich bei 25 °C stabil. Bei höheren Temperaturen neigen diese Zellen dazu, zu *white*-Zellen zu wechseln.

Efg1p hat bei diesem Phänotypwechsel ebenfalls eine bedeutende Rolle. Bei einer Überexpression von Efg1p in *opaque*-Zellen wechseln diese ihren Phänotypen zu *white*-Zellen (Sonneborn *et al.*, 1999b). Um zu untersuchen, welche Regionen im Efg1p-Protein essentiell für diesen Phänotypwechsel sind, wurden die Plasmide pBI-HAHYD-D1 (*PCK1-EFG1*-D1) bis pBI-HAHYD-D11 (*PCK1-EFG1*-D11) in die *opaque*-Form des Stammes TS3.3 transformiert. Als Positivkontrolle diente das Plasmid pBI-HAHYD (*PCK1-EFG1*) und als Negativkontrolle das Plasmid pBI (*PCK1p* ohne kodierendes *EFG1*-Gen). Jeweils sechs Transformanten pro Deletionsstamm wurden über Nacht in SD-Medium, bei 25 °C angezogen und die OD<sub>600</sub> bestimmt. 100 Zellen pro Transformante wurden in Wasser gewaschen und auf SCAA-Phloxin B (5 µg/ml) Platten ausplattiert, um den *PCK1*-Promotor zu aktivieren. Phloxin B dient zur visuellen Unterscheidung von *opaque*-Zellen, da diese durch den Farbstoff rot angefärbt werden. *white*-Zellen bleiben durch diesen Farbstoff weiß. Die Platten wurden anschließend für vier Tage bei 25 °C inkubiert.



Nach dieser Inkubationszeit ist zu sehen, dass die Hälfte der Deletionsstämme die Fähigkeit, den *white*-Phänotypen zu induzieren, verloren haben (Abb. 22). Unerwarteterweise ist der Deletionsstamm D8, der die N-terminale Region der APSES-Domäne beinhaltet und sowohl für den Dimorphismus, als auch für die Chlamydosporenbildung benötigt wurde, für diesen Phänotyp nicht relevant. Alle weiteren Deletionen, die einen Teil der APSES-Domäne beinhalten (D4, D5 und D9), zeigen einen starken Defekt im Phänotypwechsel, so dass auch für diesen Phänotypwechsel die APSES-Domäne eine wichtige Funktion aufweist. Weiterhin ist auffallend, dass die Deletionen D6 und D7, welche für die Hyphenbildung nicht essentiell waren, für den Wechsel zu *white*-Zellen von enormer Bedeutung zu sein scheinen (Abb. 23). Ein weiteres Augenmerk gilt den Deletionen D10 und D11. Diese Regionen scheinen für die Funktionalität von Efg1p nicht bedeutend zu sein, da diese für den *white/opaque*-Phänotypwechsel, aber auch für alle anderen Phänotypen unwichtig sind. Die Stämme mit den Deletionen D1, D2 und D3 zeigen in den einzelnen Kolonien vereinzelt *opaque*-Zellen, die durch die roten Sektoren auf den Kolonien sichtbar sind. Der Anteil an *opaque*-Zellen war im Stamm D3 jedoch so gering, dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Deletion keinen wesentlichen Einfluss auf den Phänotypwechsel hat. Bei den Deletionsstämmen D1 und D2 jedoch war der Anteil an *opaque*-Zellen noch relativ hoch, so dass eine aktivierende Funktion dieser Domäne beim *white/opaque*-Phänotypwechsel nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse zeigen erneut, dass Efg1p als globaler Regulator für verschiedene Prozesse unterschiedliche Regionen im Protein nutzt.

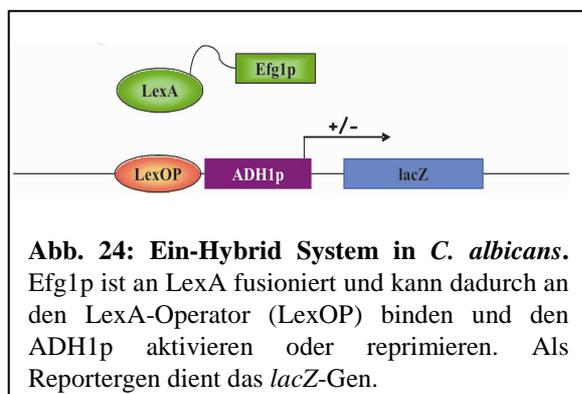


## 3.2 Repressor-Aktivität des Efg1p

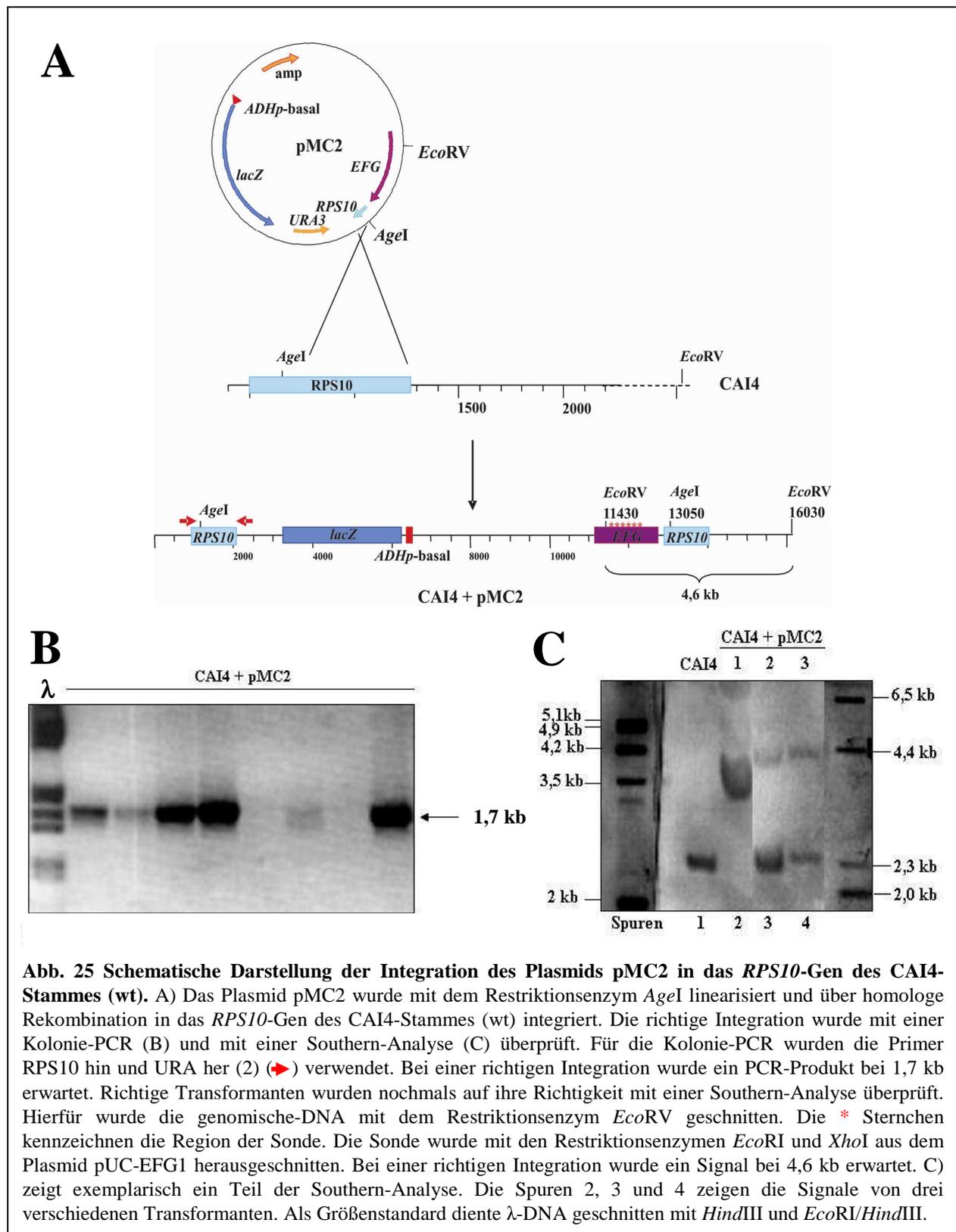
Efg1p ist ein globaler Regulator in *C. albicans*, der als Aktivator und als Repressor fungieren kann. So wird Efg1p für die Induktion der Hyphenbildung benötigt (Lo *et al.*, 1997) und dient hierbei vermutlich direkt als Aktivator. Während der Hypheninduktion wird jedoch die Expression von *EFG1* durch negative Autoregulation reduziert. Verhindert man diese negative Autoregulation, so bilden die Zellen Pseudohyphen anstelle von echten Hyphen (Tebarth *et al.*, 2003). Eine Überexpression von Efg1p führt ebenfalls zu einer Bildung von Pseudohyphen und verhindert die Induktion von Hyphen (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003), welches ein Indiz für die Repressor-Funktion ist. Des Weiteren wirkt Efg1p als Repressor der Hyphenbildung bei Sauerstoffmangel und bei Einbettung in eine Agar-Matrix (Brown *et al.*, 1999; Sonneborn *et al.*, 1999a; Giusani *et al.*, 2002; Setiadi, E.R. *et al.*, 2006). Doedt *et al.* (2004) konnten bereits in einem Ein-Hybrid Experiment zeigen, dass Efg1p in *C. albicans* als Repressor agiert.

### 3.2.1 Repressor-Aktivität in Kinase-Mutanten

Das Protein Efg1 ist ein Phosphoprotein, das durch die Proteinkinase A am Threonin 206 phosphoryliert wird (Bockmühl, 2001). In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Repressor-Aktivität des Efg1-Proteins in verschiedenen Kinase-Mutanten verändert ist. Für diesen Versuch wurde ein für *C. albicans* optimiertes Ein-Hybrid System genutzt, welches aus einem *Staphylococcus* LexA-Efg1p Fusionsprotein und einem LexA-Operator-lacZ-Fusion bestand. Bei einer Expression des LexA-Efg1-Proteins bindet LexA an den LexA-Operator, der den basalen *ADH1*-Promotor reguliert. Efg1p kann dann den *ADH1*-Promotor aktivieren oder reprimieren. Die Promotoraktivität wird durch das Reportergen lacZ bestimmt (Abb. 24).



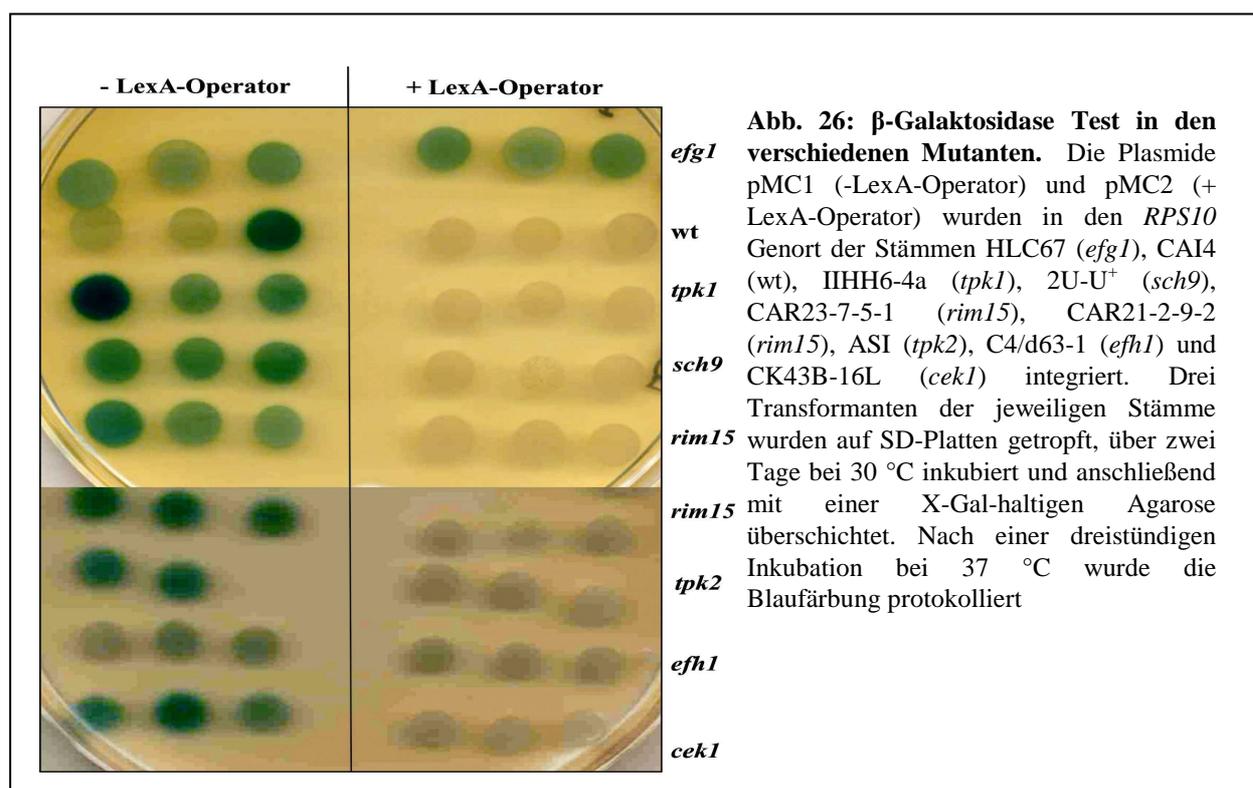
Für diesen Versuch wurde das Plasmid pMC2 (+LexA-Operator) und als Kontrolle das Plasmid pMC1 (-LexA-Operator) im *RPS10*-Gen mit *AgeI* geschnitten und in verschiedene Mutanten über homologe Rekombination in das *RPS10* Gen integriert. Als Kinase-Mutanten dienten die Stämme IIIH6-4a (*tpk1/tpk1*), 2U-U<sup>+</sup> (*sch9/sch9*), CAR23-7-5-1 und CAR21-2-9-2



(*rim15/rim15*), ASI (*tpk2/tpk2*) und CK43B-16L (*cek1/cek1*). Neben diesen Kinase-Mutanten wurde die Aktivität ebenfalls in C4/d63-1 (*efh1/efh1*) und HLC67 (*efg1/efg1*) gemessen. Als Kontrollstamm diente CAI4 (wt). In Abb. 25 A ist als Beispiel die Integration in den Wildtyp-Stamm CAI4 schematisch dargestellt. Die richtige Integration wurde mit einer Kolonie-PCR und

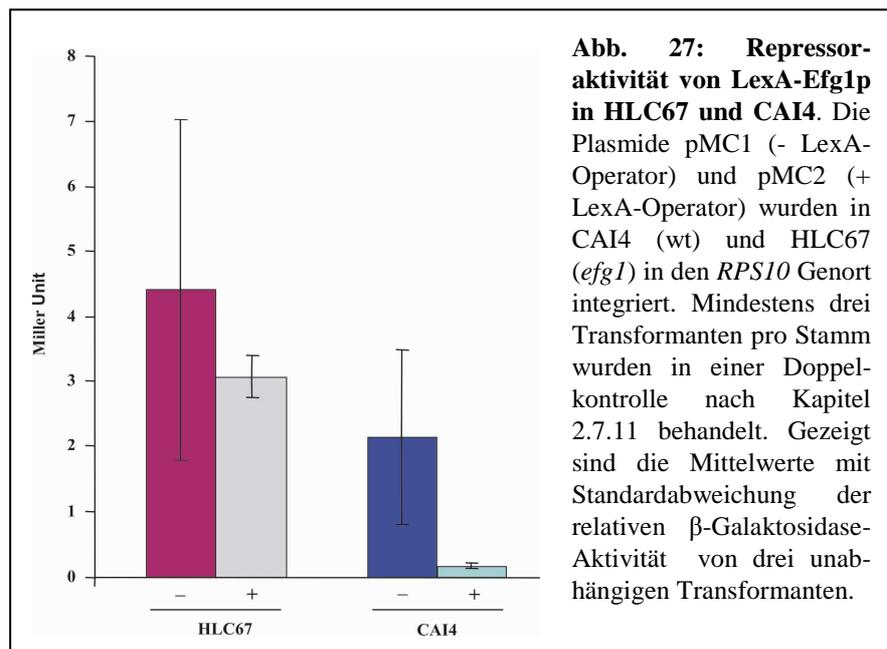
einer Southern-Analyse untersucht. Für die Kolonie-PCR wurden die Transformanten mit den Primern RPS10 hin und URA3 her (2) überprüft. Bei einer richtigen Integration wurde ein PCR-Produkt bei 1,7 kb erwartet. In Abb. 25 B ist exemplarisch ein Ergebnis von einer Kolonie-PCR gezeigt. Richtige Transformanten wurden weiter auf ihre Korrektheit mit einer Southern-Analyse verifiziert. Hierfür wurde die genomische-DNA der Transformanten mit *EcoRV* geschnitten und mit einem 1,1 kb großen *EFG1*-Genfragment, welches mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem Plasmid pUC-EFG1 herausgeschnitten wurde, untersucht. In Abb. 25 C ist exemplarisch eine Southern-Analyse gezeigt. Bei richtigen Transformanten wurde ein Signal bei 4,6 kb erwartet. Spur 3 und 4 zeigen Transformanten mit einer richtigen Integration. Das Signal bei 2,4 kb wird vom ursprünglichen *EFG1*-Gen verursacht.

Um einen ersten Überblick über die lacZ-Aktivität in den einzelnen Stämmen zu erhalten wurde zunächst ein X-Gal-Overlay (2.7.10) durchgeführt. Jeweils drei Transformanten pro Stamm wurden auf eine SD-Platte getropft und nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C mit X-Gal-haltiger Agarose überschichtet. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C ist zu sehen, dass die Transformanten mit dem Plasmid pMC1(-LexA-Operator) eine Basalaktivität aufweisen. Bei Anwesenheit des LexA-Operators verringert sich die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, da Efg1p in diesem System als Repressor der Genfunktion fungiert (Abb. 26). Unerwarteterweise ist nur im HLC67 (*efg1*) Stammhintergrund keine Repressoraktivität von Efg1p zu verzeichnen.



**Abb. 26:  $\beta$ -Galaktosidase Test in den verschiedenen Mutanten.** Die Plasmide pMC1 (-LexA-Operator) und pMC2 (+ LexA-Operator) wurden in den *RPS10* Genort der Stämmen HLC67 (*efg1*), CAI4 (wt), IIHH6-4a (*tpk1*), 2U-U<sup>+</sup> (*sch9*), CAR23-7-5-1 (*rim15*), CAR21-2-9-2 (*rim15*), ASI (*tpk2*), C4/d63-1 (*efh1*) und CK43B-16L (*cek1*) integriert. Drei Transformanten der jeweiligen Stämme wurden auf SD-Platten getropft, über zwei Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend mit einer X-Gal-haltigen Agarose überschichtet. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Blaufärbung protokolliert

Dieses Ergebnis konnte durch einen Flüssigttest (2.7.11) bestätigt werden. In allen Stämmen, außer bei HLC67 (*efg1*), konnte eine deutliche Verminderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Gegenwart des LexA-Operators beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In Abb. 27 ist zu sehen, dass im Kontrollstamm CAI4 (wt) eine deutliche Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Anwesenheit des LexA-Operators (+) zu sehen ist. Im Gegensatz dazu ist im Stamm HLC67 (*efg1*) keine signifikante Verminderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu beobachten.



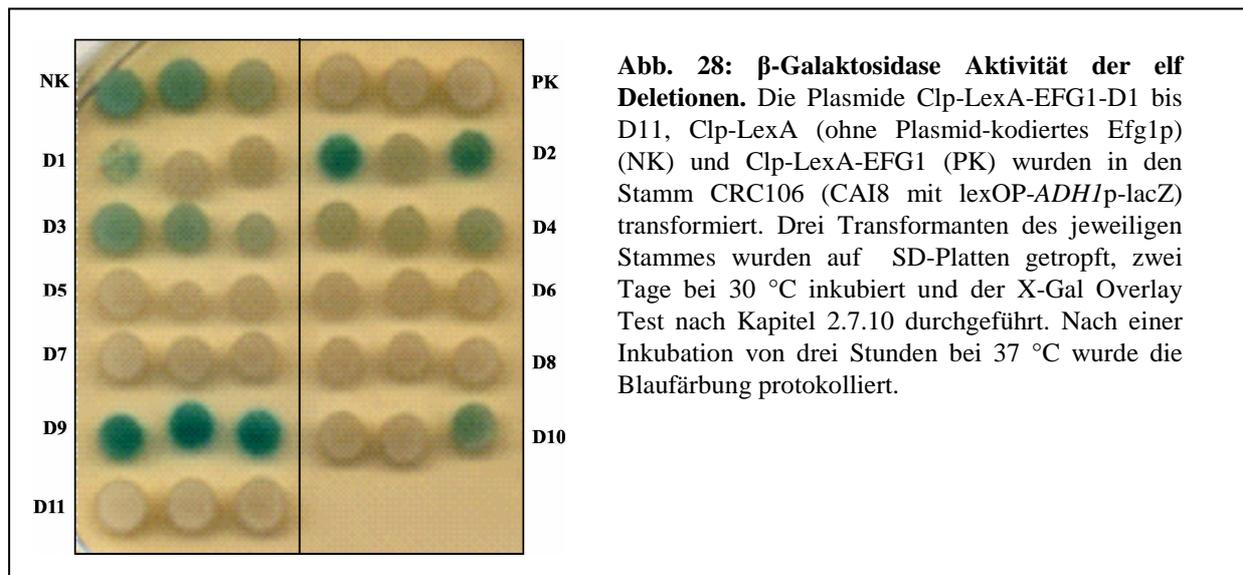
**Abb. 27: Repressoraktivität von LexA-Efg1p in HLC67 und CAI4.** Die Plasmide pMC1 (- LexA-Operator) und pMC2 (+ LexA-Operator) wurden in CAI4 (wt) und HLC67 (*efg1*) in den *RPS10* Genort integriert. Mindestens drei Transformanten pro Stamm wurden in einer Doppelkontrolle nach Kapitel 2.7.11 behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von drei unabhängigen Transformanten.

Möglicherweise agiert Efg1p in diesem System als Homodimer und benötigt für die Repressorfunktion mindestens ein unverändertes Efg1p, da das LexA eine sterisch ungünstige Lage einnimmt. Dieses ist jedoch in der *efg1*-Mutante nicht gegeben, so dass Efg1p nicht als Repressor fungieren kann. Um zu untersuchen, ob der Verlust der Repressoraktivität Auswirkungen auf den Dimorphismus hat, wurden jeweils drei

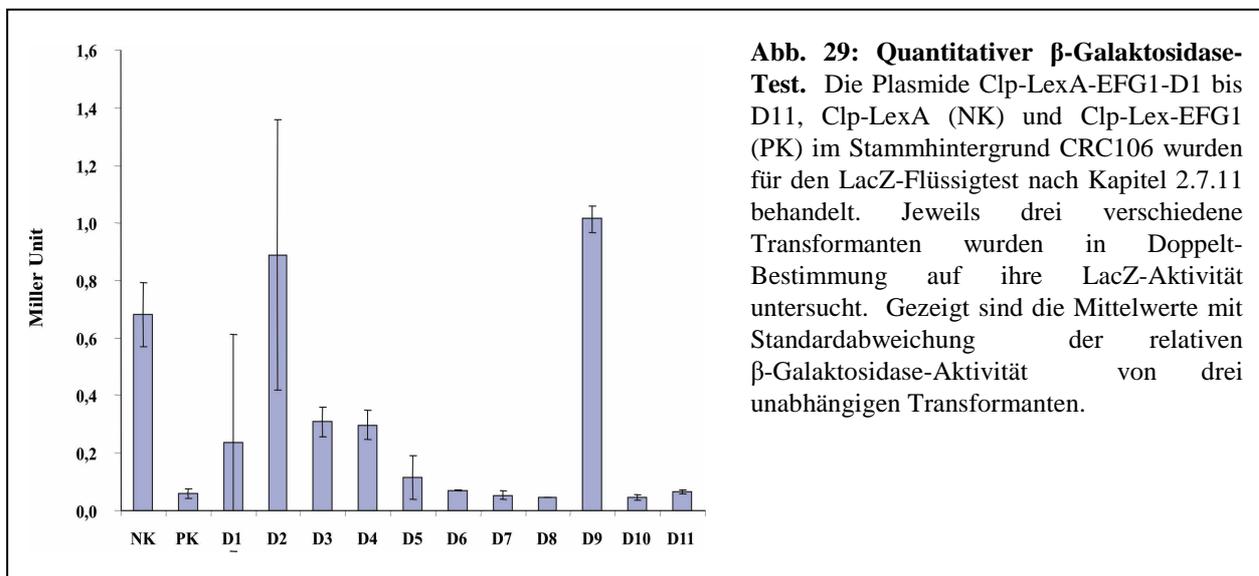
Transformanten auf Lee's-Platten und in 5 % Serum Flüssigmedium auf ihre Hyphenbildung untersucht. In beiden Fällen wurde eine Bildung von echten Hyphen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass möglicherweise die Repressorfunktion von Efg1p in diesem System nicht seine Funktion im Dimorphismus reflektiert.

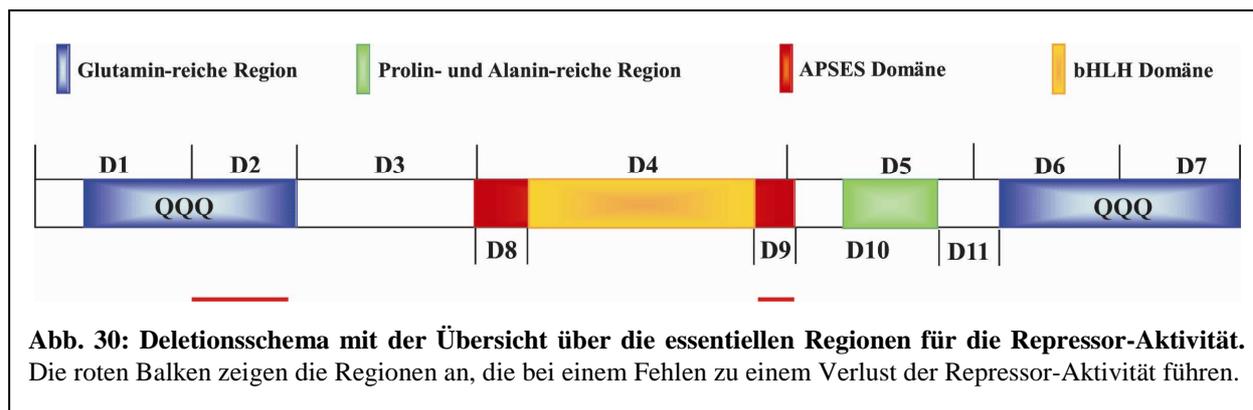
### 3.2.2 Repressor-Aktivität in *EFG1*-Deletionen

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welcher Region des Efg1p die Repressorfunktion lokalisiert ist. Um dieses zu überprüfen wurden über Mutagenese-PCR dieselben elf Deletionen (Abb. 7) in das Plasmid Clp-LexA-EFG1 eingeführt. Dieses Plasmid exprimiert das LexA-Efg1 Fusionsprotein. Die elf Plasmide Clp-LexA-EFG1-D1 bis Clp-LexA-EFG1-D11 wurden in den Stamm CRC106 transformiert. Dieser Stamm enthält bereits den LexA-Operator fusioniert an den *ADHI*-Promotor mit dem Reportergen *lacZ*. Zur Kontrolle wurden die Plasmide Clp-LexA (ohne *EFG1*) (Negativkontrolle) und Clp-LexA-EFG1 (Positivkontrolle) mitgeführt. Mit diesen Transformanten wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Test durchgeführt (2.7.10). In Abb. 28 ist die Basalaktivität in der Negativkontrolle (NK) zu sehen. Bei Anwesenheit von Efg1p ist eindeutig die erwartete Reprimierung in der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu verzeichnen (PK). Diese Reprimierung ist ebenfalls tendenziell in den Transformanten D1, D5, D6, D7, D8, D10 und D11 wieder zu finden. Eine veränderte Repressor-Aktivität ist in den Transformanten D2, D3, D4 und D9 zu sehen, die jedoch in den einzelnen Stämmen stark variiert.



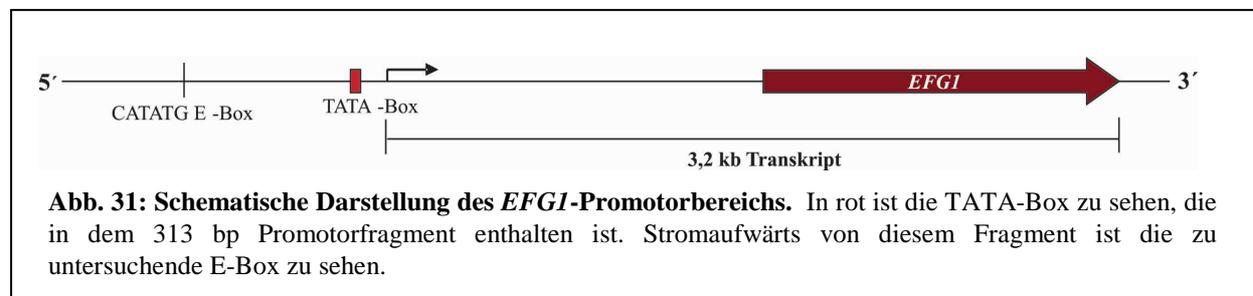
Um diese Ergebnisse eindeutig verifizieren zu können wurde ein quantitativer  $\beta$ -Galaktosidase-Test (2.7.11) durchgeführt. Die Ergebnisse (Abb. 29) bestätigen die Daten des vorangegangenen Versuchs. Auch in diesem Test zeigen die Transformanten D2, D3, D4 und D9 eine geringere Repressor-Aktivität. In den Stämmen D2 und D9 ist eine höhere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als in der Negativkontrolle (NK) zu sehen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die reprimierende Aktivität des LexA-Efg1p-Fusionsproteins hier verloren gegangen ist. So scheint die Repressor-Aktivität von Efg1p in der N-terminalen Glutaminreichen Region und am C-terminalen Ende der APSES-Domäne lokalisiert zu sein (Abb. 30).



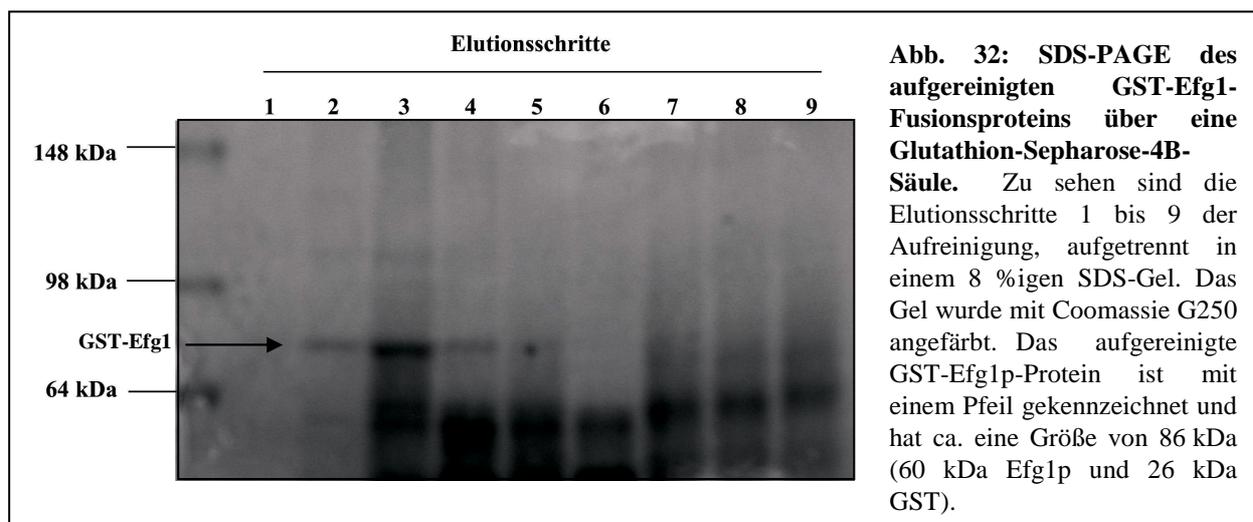


### 3.3 *In vitro* Untersuchungen zur Bindung von Efg1p an die E-Box 5'-CATATG-3'

Wie im vorangegangenen Kapitel erwähnt, reguliert Efg1p die Expression seines eigenen Transkripts über negative Autoregulation (Tebarth *et al.*, 2003). In der Arbeit von Bußmann (2006) konnte über Footprint-Analyse gezeigt werden, dass weiter stromaufwärts im *EFG1*-Promotorbereich eine E-Box mit der Sequenz 5'-CATATG-3' durch Efg1p gebunden wird (Abb. 31). E-Boxen mit der Konsensus-Sequenz 5'-CANNTG-3' sind bekannt dafür, dass sie durch Transkriptionsfaktoren mit einer bHLH-Domäne gebunden werden (Massari und Murre, 2000; Robinson und Lopes, 2000). Um dieses Ergebnis der Footprint-Analyse bestätigen zu können, wurde ein *in vitro* Gelretardierungsexperiment durchgeführt, in dem die Bindung von Efg1p an diese E-Box untersucht wurde.



Um die Bindung von Efg1p an die E-Box zu überprüfen, wurde eine GST-Efg1-Fusion (Plasmid pMi11) in *E. coli* überproduziert (Doedt, 2000). Nach der Rohextraktaufbereitung wurden die Proteine über eine Glutathion-Sepharose 4B-Säule mit 1 ml-Bettvolumen aufgereinigt. Anschließend folgten Waschschritte mit PBS und die einzelnen Elutionsschritte mit 500 µl Fraktionen.



Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und zur visuellen Erkennung des GST-Efg1 Fusionsproteins mit Coomassie G250 angefärbt. Wie in Abb. 32 zu sehen ist, konnte das GST-Efg1-Protein in Fraktion 2 ohne größere Verunreinigungen isoliert werden. Diese Fraktion wurde für die weiteren Versuche verwendet. Für die nachfolgenden Verzögerungsgele wurden synthetische Oligonukleotide eingesetzt, in denen die flankierenden Bereiche der E-Box identisch zur *EFG1*-Promotorregion sind. Um zu überprüfen, ob eine Stabilisierung der DNA-Protein-Bindung durch verlängerte Oligonukleotide möglich ist, wurden drei verschiedene Oligonukleotide verwendet, die jeweils um fünf Basen pro Seite verlängert wurden (Abb. 33).

```

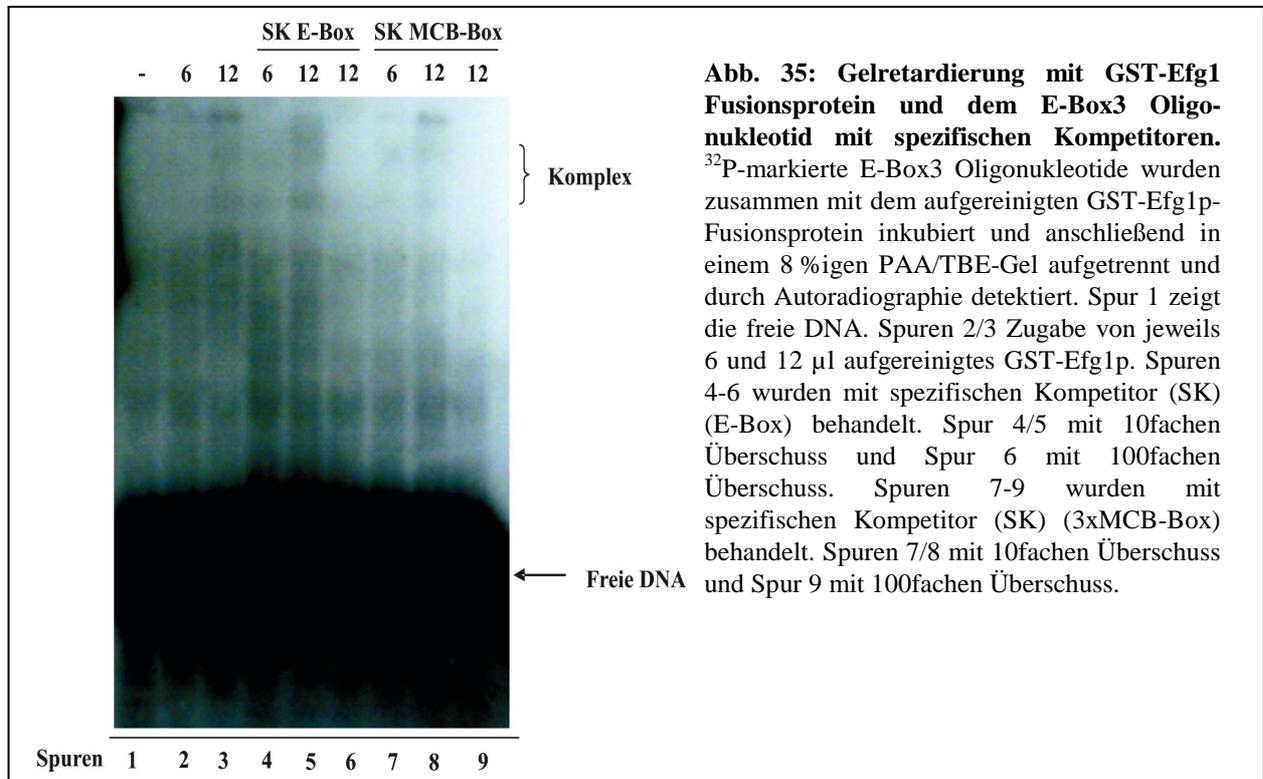
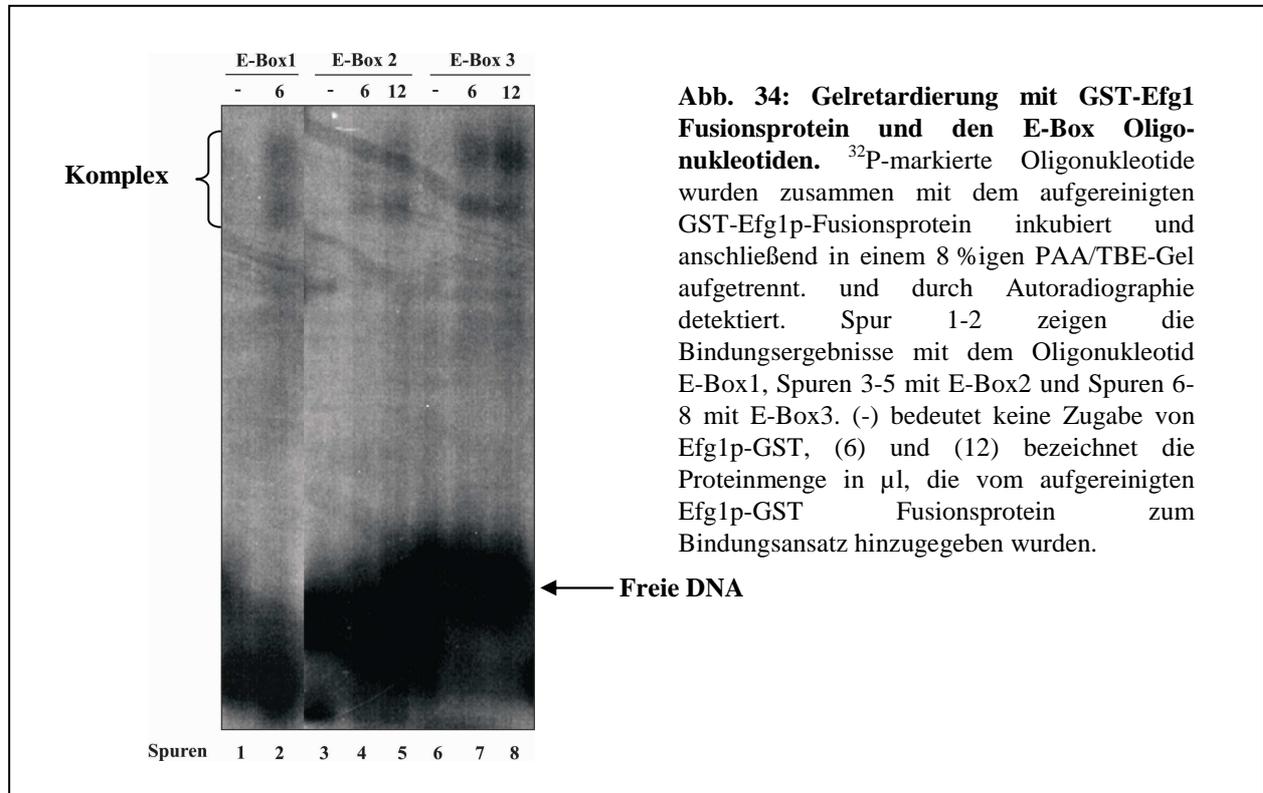
E-Box1          5'–ATATATGCATATATGCATATGTGCATATAACCAATTA – 3'
E-Box2          5' – CAAGTATATATGCATATATGCATATGTGCATATAACCAATTAGCAAT – 3'
E-Box3          5'– ATATACAAGTATATATGCATATATGCATATGTGCATATAACCAATTAGCAATACTGC – 3'
  
```

**Abb. 33: Synthetische Oligonukleotide zur *in vitro* Untersuchung der Bindung von GST-Efg1p an die E-Box.** Rot hervorgehoben ist die E-Box Sequenz. Die flankierenden Bereiche entsprechen der *EFG1*-Promotorsequenz.

Die Oligonukleotide wurden mit T4-Polynukleotidkinase und  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert und mit den komplementären Strängen inkubiert, um doppelsträngige DNA zu erhalten. Der 20  $\mu$ l Bindungsansatz enthielt in der Regel Poly(dI-dC) als unspezifischen Kompetitor, um nicht spezifische Bindungen abzufangen. Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Signale durch eine spezifische Bindung zwischen Oligonukleotiden und GST-Efg1p entstanden sind, wurde als spezifischer Kompetitor unmarkiertes Oligonukleotid in einem 10 und 100 fachen Überschuss eingesetzt. Von der Protein-Lösung wurden 6  $\mu$ l und 12  $\mu$ l in den Bindungsansatz hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden die Bindungsansätze in einem 8 %igen nicht-denaturierenden PAA/TBE-Gel aufgetrennt, getrocknet und anschließend durch Autoradiographie detektiert.

In Abb. 34 sind Signale der DNA-Protein-Bindungen in der oberen Hälfte des Bildes zu sehen. Auch ist durch eine Erhöhung der Proteinmenge und eine Verlängerung der Oligonukleotide das Bindungssignal stärker. Insgesamt sind diese Signale aber sehr schwach. Zur Überprüfung, ob diese Signale tatsächlich durch die Bindung von GST-Efg1p an die E-Box entstanden sind, wurden unmarkierte Oligonukleotide (E-Box) als spezifische Kompetitoren in einem 10fachen und 100fachen Überschuss eingesetzt. In Abb. 35 ist zu sehen, dass das Bindungssignal bei einer

Zugabe von 10fachem E-Box-Überschuss nicht reduziert wird (Abb. 35). Es ist jedoch deutlich zu sehen, dass bei einem 100fachen Überschuss eine Reduzierung stattfindet. Dieses Ergebnis zeigt, dass das GST-Efg1-Fusionsprotein spezifisch an die E-Box gebunden hat.



In Ein-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *C. albicans* Efg1p an ein MCB-Element 5'-ACGCGT-3' *in vivo* bindet (Doedt, 2004; Hilbig, 2004). Dieses konnte durch ein Verzögerungsgel mit einem Oligonukleotid, bestehend aus einem 3fachen MCB-Element, *in vitro* bestätigt werden (Bußmann, 2006). In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die DNA-Protein-Bildung mit der E-Box durch einen Überschuss an MCB-Element reduziert werden kann. Dafür wurde zum Bindungsansatz (E-Box und GST-Efg1p) ein 10facher und 100facher Überschuss an 3fachem MCB-Element eingesetzt und untersucht, ob eine eventuelle Verminderung des oben beobachteten Signals zu sehen ist. In Abb. 35 ist zu erkennen, dass auch hier durch Zugabe von 10fachem MCB-Element die Signale nicht reduziert werden können. Dennoch wird bei einem 100fachen Überschuss das Bindungssignal reduziert. Durch diesen Kompetitionstest konnte gezeigt werden, dass das Bindungssignal zwischen GST-Efg1p und E-Box durch das MCB-Element eliminiert werden kann. Daraus kann gefolgert werden, dass Efg1p an das MCB-Element *in vitro* bindet, und dass E-Box- und MCB-Box-Bindestelle an Efg1p identisch sind.

### 3.4 Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von Efg1p

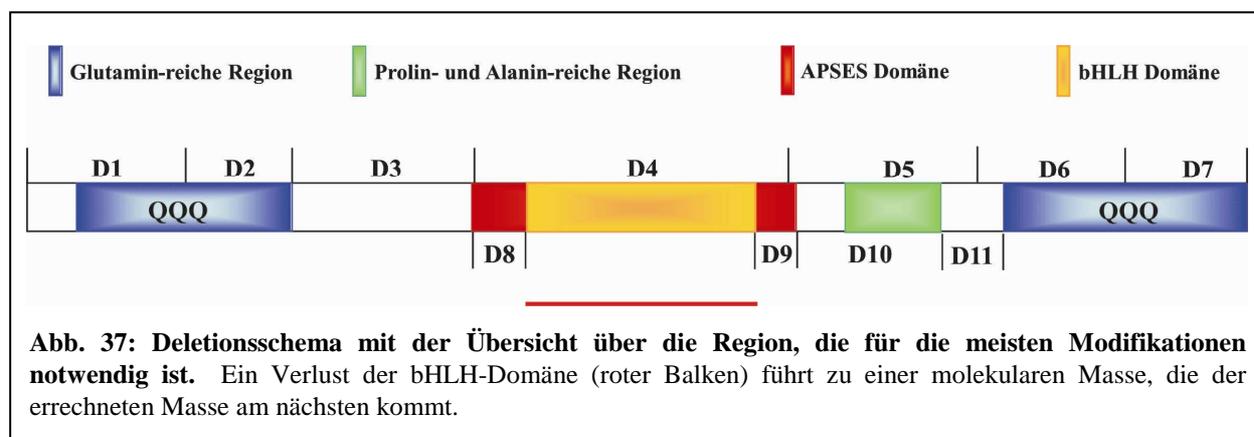
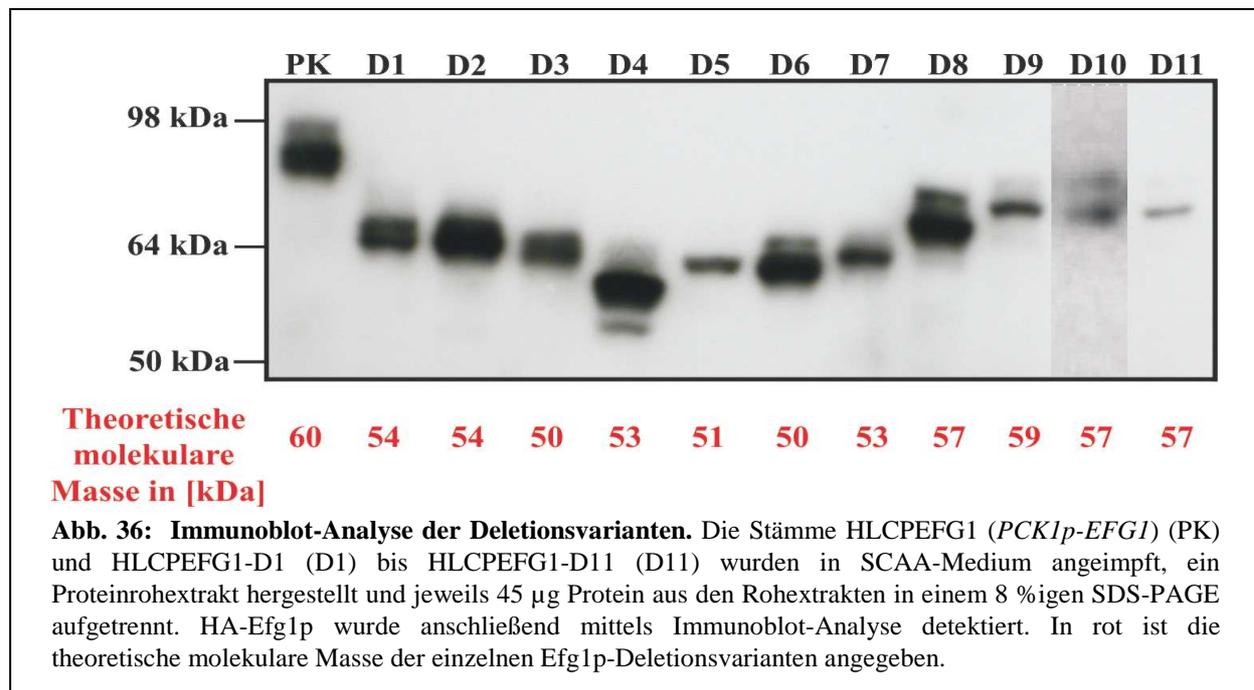
Das Efg1-Protein hat eine theoretische Masse von 61 kDa. In einer Immunoblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass Efg1p sowohl in *C. albicans* als auch in *S. cerevisiae* (Sonneborn, 1999) ein verändertes Laufverhalten zeigt und als Dreifach-Bande bei einer Größe von 86-90 kDa detektiert wird. Bei einer Überexpression von Efg1p in *E. coli* jedoch konnte das Protein bei der gewünschte Größe detektiert werden (Doedt, 2000). Auch das GST-Efg1p-Fusionsprotein aus *E. coli* zeigt die errechnete molekulare Masse von 86 kDa (Abb. 32). Somit ist wahrscheinlich, dass Efg1p posttranslational in *C. albicans* und *S. cerevisiae* modifiziert wird. Mit Hilfe von Phospho-Threonin-Antikörpern konnte bereits nachgewiesen werden, dass Efg1p phosphoryliert ist (Bockmühl, 2001). Mögliche Phosphorylierungen an mehreren Stellen des Proteins erklären jedoch nicht den starken Größenunterschied. Auch wurden Untersuchungen zur möglichen *O*-Glykosylierung von Efg1p mit einem *O*-GlcNAc-Antikörper durchgeführt (Sonneborn, 1999), die jedoch negativ verliefen.

#### 3.4.1 Untersuchung der posttranslationalen Modifikation der *EFG1*-Deletionen

Um die Positionen der Modifizierungen näher bestimmen zu können, wurden die Efg1p-Deletionsvarianten in einem Immunoblot auf ihre Größe untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Stämme HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) und HLCPEFG1-D1 (*PCK1p-EFG1-D1*) bis HLCPEFG1-D11 (*PCK1p-EFG1-D11*) in 30 ml SCAA-Medium angeimpft und aus diesen Rohextrakte präpariert. Jeweils 45 µg Protein wurden in einem 8 %igen Tris/Glycin-Gel aufgetrennt.

Wie in Abb. 36 zu sehen ist, zeigen alle Deletionen weiterhin ein verändertes Laufverhalten, die von der theoretischen molekularen Masse abweicht. Ein besonderes Augenmerk gilt Deletion D4. Diese Variante zeigt im Verhältnis zu den anderen Deletionen einen wesentlich geringeren Größenunterschied zur theoretischen Masse. Dieses Ergebnis bedeutet jedoch nicht, dass die APSES-Domäne insgesamt stark modifiziert wird, da die Deletionen D8 und D9, die die flankierenden APSES-Bereiche der bHLH-Domäne beinhalten, weiterhin einen großen Unterschied zur errechneten Masse aufweisen. Mit diesen Ergebnissen kann aber nicht mit Sicherheit die tatsächliche Position der Modifikationen bewiesen werden, da der

Modifikationsort und die dafür erforderlichen Sequenzen nicht in der APSES-Domäne lokalisiert sein müssen.



### 3.4.2 Phosphorylierung der *EFG1*-Deletionen

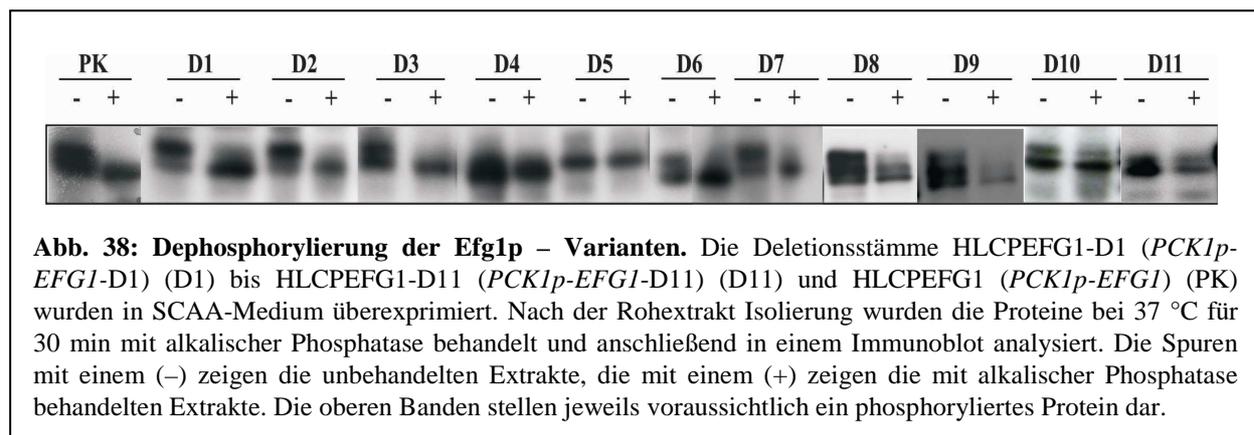
Efg1p ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im PKA-Signaltransduktionsweg. Die einzelnen Proteine dieses Stoffwechselweges werden durch Kinasen phosphoryliert und dadurch reguliert. Wie bereits in der Arbeit von Bockmühl (2001) nachgewiesen werden konnte, ist Efg1p ein Phosphoprotein, das am Threonin 206 durch die Proteinkinase A phosphoryliert wird. In einem Immunoblot wird das Fusionsprotein HA-Efg1p aus *C. albicans* als zweifach bzw. dreifach-Bande detektiert. Die obere der drei Banden ist hierbei die schwächere und instabilere (Sonneborn, 1999).

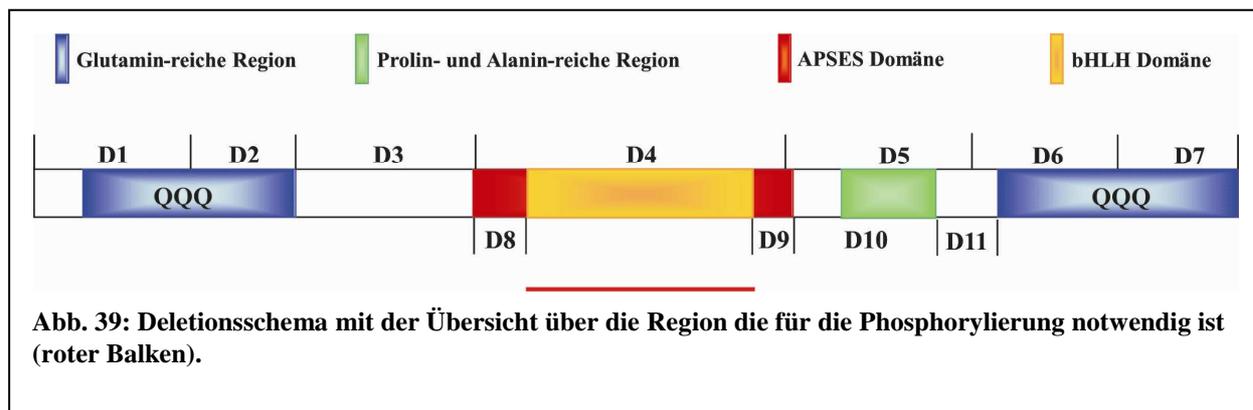
In diesem Experiment sollte durch Dephosphorylierung von Efg1p-Deletionsvarianten ein Überblick über weitere Efg1p-Regionen erhalten werden, die für die Phosphorylierung notwendig sind. Für die bisherigen Versuche wurden SDS-Minigele verwendet, indem die

Auftrennung kleiner Größenunterschiede, die durch Phosphorylierungen entstehen nicht möglich ist. Aus diesem Grund wurden in diesen Versuchen mit längeren SDS-PAGE-Apparaturen gearbeitet, in denen eine bessere Auftrennung möglich ist.

Nach einer Überexpression der *EFG1*-Fusionen in den Stämmen HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) und HLCPEFG1-D1 (*PCK1p-EFG1-D1*) bis HLCPEFG1-D11 (*PCK1p-EFG1-D11*) in SCAA-Medium wurden Rohextrakte präpariert. 50 µg Proteinsuspension wurden für 30 min bei 37 °C mit alkalischer Phosphatase behandelt, in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot-Analyse detektiert.

Die Immunoblot-Analyse (Abb. 38) zeigt, dass die Deletion D4, die die APSES-Domäne entfernt, nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase keinen Unterschied in ihrem Laufverhalten aufweist. Die einzige Efg1p-D4 Bande, die im Immunoblot detektiert werden konnte, zeigt keinen Größenunterschied nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase. Die Deletionen D8 und D9, die die flankierenden Bereiche der bHLH-Domäne in der APSES-Domäne beinhalten, zeigen einen Verlust der oberen beiden Banden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die bHLH-Domäne in der APSES-Domäne mehrfach phosphoryliert ist bzw. dieser Bereich für die Phosphorylierung notwendig ist. Auch die Deletion D5, die ebenfalls nur eine Bande aufweist und in der Alanin- und Prolin-reichen Domäne lokalisiert ist, zeigt nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase kein verändertes Laufverhalten. Die Deletionen D10 und D11, die in D5 beinhaltet sind, zeigen dagegen einen Verlust der oberen Bande nach einer Inkubation mit alkalischer Phosphatase. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Alanin- und Prolin-reiche Domäne wahrscheinlich nicht oder nur wenig phosphoryliert ist. Möglicherweise ist durch die größere Deletion D5, die ebenfalls einen kleinen Teil der APSES-Domäne beinhaltet (Abb. 39), die Konformation von Efg1p verändert, so dass keine Phosphorylierungen in der APSES-Domäne möglich sind. Durch das Ausbleiben der Phosphorylierung in der APSES-Domäne, zeigt D5 möglicherweise nur eine Bande im Immunoblot. Bei allen anderen Deletionen ist zu sehen, dass die obere der beiden bzw. die beiden oberen Banden nach einer Dephosphorylierung nicht zu detektieren sind. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass tendenziell die Phosphorylierungen von Efg1p in der bHLH-Domäne zu suchen sind. Diese Ergebnisse lassen jedoch keine Rückschlüsse über die Anzahl der Phosphorylierungen im Efg1p zu.





### 3.4.3 Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von Efg1p

Da bis zu diesem Zeitpunkt das veränderte Laufverhalten von Efg1p nicht aufgeklärt werden konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Modifikationsmöglichkeiten an Efg1p untersucht. Neben der Glykosylierung und der Phosphorylierung werden Proteine durch kovalente Verknüpfung mit kurzen Polypeptiden modifiziert. Diese Modifikationen haben ebenfalls eine regulatorische Funktion. So dient das Ubiquitin (~8,5 kDa)-Polypeptid Verknüpfungen zur Degradierungsmarkierung bzw. zur Regulation von Proteinen. Aber auch durch die Verknüpfung von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen, wie z.B. SUMO (~ 10 kDa) oder RUB (~9,7 kDa), werden Proteine modifiziert (Goettsch und Bayer, 2002)

1. Um eine mögliche Ubiquitinierung am Efg1p nachzuweisen, wurde HA-Efg1p mittels Anti-HA Antikörpern immunopräzipitiert und anschließend in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Bei der anschließenden Immunoblot-Analyse wurde ein spezifischer Ubiquitin-Antikörper zur Detektion verwendet. Hierbei konnte kein Signal in der Höhe des Efg1p-Proteins ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).
2. Für die Untersuchung, ob Efg1p möglicherweise an SUMO gekoppelt wird, wurde das Plasmid p3xHA-SMT3, welches für ein Epitop markiertes HA-Smt3-Protein kodiert, in die Stämme CAI4 (wt) und HLC67 (*efg1*) transformiert. Die Transformanten wurden in SD- und SCAA-Medium angezogen und Rohextrakte präpariert. In einer Immunoblot-Analyse wurde das HA-Smt3p-Signal untersucht. Wäre Efg1p durch SUMO modifiziert, so würde ein HA-Smt3p-Signal auf der Laufhöhe von Efg1p im CAI4-Stamm erwartet, die bei der *efg1*-Mutante nicht zu sehen wäre. In beiden Stämmen konnte auf der Höhe des Efg1p keine Sumoylierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).
3. Um die Modifikation von Efg1p durch RUB nachzuweisen, wurde in die *C. albicans rub1*-Mutante (KC208) das Plasmid pBI-HAHDY (*PCK1p*-HA-*EFG1*) transformiert und diese in SD- und SCAA-Medium angezogen. Nach einem Immunoblot konnte das HA-Efg1p unverändert auf der Höhe bei ca. 90 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Efg1p weder durch Ubiquitin, noch durch Ubiquitin-ähnliche Proteine SUMO und RUB modifiziert wird.

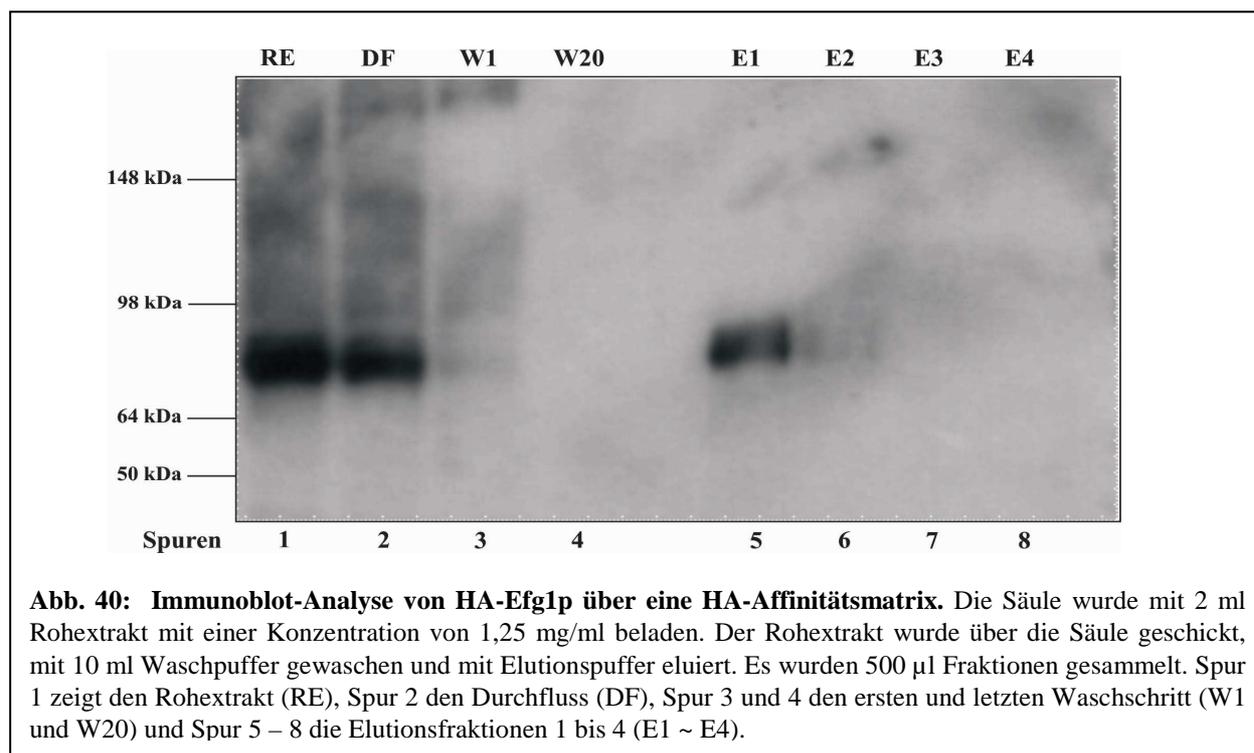
### 3.5 Vorversuche zur Isolierung von Efg1p und seinen Interaktionspartnern

Efg1p ist ein Transkriptionsfaktor in *C. albicans*, der sowohl für morphogenetische Prozesse, als auch für die Induktion von Virulenzfaktoren und dem Metabolismus essentiell ist. In Anbetracht dieser vielfältigen Aufgaben könnte Efg1p möglicherweise mit vielen verschiedenen Proteinen interagieren und unterschiedliche Modifikationen erhalten, um diese verschiedenen Mechanismen auszulösen. In einer Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass Efg1p mit der Histondeacetylase Sin3p interagiert und so wahrscheinlich seinen eigenen Promotor nach Hypheninduktion reprimiert (Doedt, 2004). Neben dieser Interaktion sind weitere Interaktionen mit den Proteinen Czf1p und Flo8p bekannt (Cao *et al.*, 2006; Vines *et al.*, 2006)

In diesem Teil der Arbeit sollte Efg1p isoliert werden, um die posttranslationalen Modifikationen durch massenspektroskopische Analysen zu untersuchen. Des Weiteren sollte in diesem Zusammenhang versucht werden, weitere Efg1p-Interaktionspartner zu isolieren.

#### 3.5.1 Isolierung von Efg1p über eine HA-Affinitätsmatrix

Um Efg1p und mögliche Interaktionspartner isolieren zu können, wurde eine HA-Affinitätsmatrix eingesetzt. Diese Matrix wurde verwendet, weil Efg1p bisher nur als N-terminal HA markierte Version in *C. albicans* funktionell und in einem Immunoblot detektierbar ist. In früheren Arbeiten wurde bereits versucht, Efg1p mit einem c-myc-Epitop bzw. mit dem artifiziellen FLAG-Epitop zu fusionieren. Diese Versuche verliefen jedoch erfolglos, da Efg1p als Myc-markierte Version funktionell war, jedoch in einem Immunoblot nicht nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu war Efg1p mit dem N-terminalen FLAG-Epitop im Immunoblot detektierbar, aber nicht funktionell in der Komplementation einer *efg1*-Mutante (Doedt, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurden daher Versuche unternommen Efg1p C-terminal mit 3xFLAG zu fusionieren. Dieses Protein erwies sich als funktionell, konnte aber durch starke Hintergrundbanden nicht von unspezifischen Signalen unterschieden werden. Aus

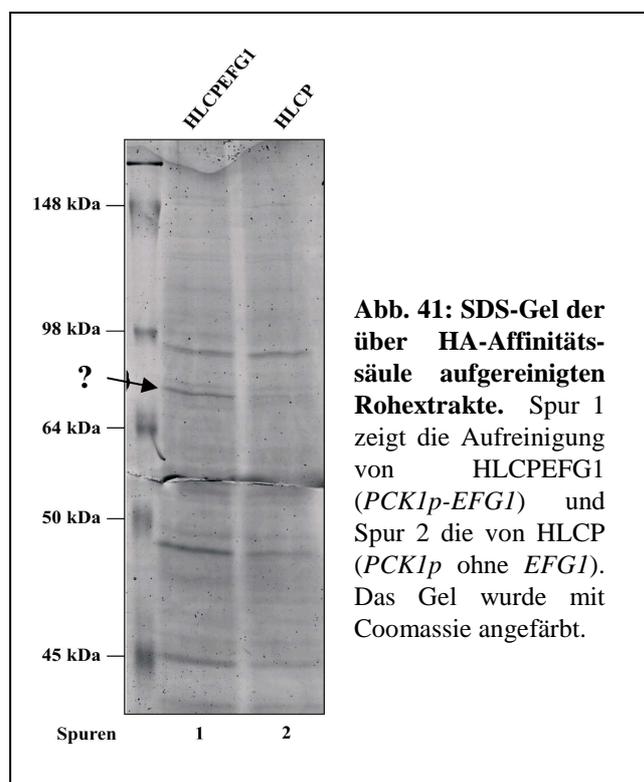


**Abb. 40: Immunoblot-Analyse von HA-Efg1p über eine HA-Affinitätsmatrix.** Die Säule wurde mit 2 ml Rohextrakt mit einer Konzentration von 1,25 mg/ml beladen. Der Rohextrakt wurde über die Säule geschickt, mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt. Spur 1 zeigt den Rohextrakt (RE), Spur 2 den Durchfluss (DF), Spur 3 und 4 den ersten und letzten Waschschrift (W1 und W20) und Spur 5 – 8 die Elutionsfraktionen 1 bis 4 (E1 ~ E4).

diesen Gründen wurde eine Affinitätschromatographie mit dem HA-Epitop markierten Efg1-Protein durchgeführt.

Es wurde der *C. albicans* Stamm HLCPEFG1 (*PCK1p*-HA-*EFG1*) verwendet, da in diesem Stamm das *EFG1*-Gen unter der Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors steht. Dieser Promotor ist in glukosehaltigen Medien reprimiert und wird in Abwesenheit von Glukose aktiviert. Zur Expression von HA-Efg1p wurde der Stamm HLCPEFG1 in 100 ml SCAA-Medium wachsen gelassen und danach wurden Rohextrakte der Zellen präpariert. Die isolierten Proteine wurden auf eine Konzentration von 1,25 mg/ml mit *Candida*-Lysepuffer (2.7.1) verdünnt. Für die Affinitätschromatographie wurde die Säule (Bettvolumen von 0,5 ml) mit 2 ml Rohextrakt beladen und anschließend mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Es wurden insgesamt 20 Waschfraktionen gesammelt. Die Elution erfolgte mit HA-Peptiden in Equilibrierungspuffer. Über die gesamte Affinitätschromatographie wurden 500 µl Fraktionen gesammelt. Um zunächst zu untersuchen, ob und in welcher Elutionsfraktion Efg1p isoliert werden konnte, wurden eine Immunoblot-Analyse und eine Silbernitrat-Färbung eines Gels durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 30 µl pro Fraktion in einem SDS-Gel aufgetrennt.

In Abb. 40 ist zu sehen, dass in der ersten Elutionsfraktion das HA-Efg1 Protein vorhanden ist. Des Weiteren ist zu sehen, dass nicht alle Efg1 Proteine im Rohextrakt an die Säule gebunden haben, da in der DF-Fraktion ebenfalls Efg1-Signale zu sehen sind. Die Ursache für dieses Verhalten könnte in der Überladung der Säule begründet sein.



Im Silbernitrat-gefärbten Gel traten keine Banden in Höhe des Efg1p auf, so dass angenommen wurde, dass die isolierte Menge an Efg1p in der E1-Fraktion zu gering war. Aus diesem Grund wurden bei der nächsten Aufreinigung fünf mal 2 ml Rohextrakt, wie bereits beschrieben aufgereinigt, die E1-Fractionen vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationssäule mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf ein Volumen von 150 µl eingengt. Neben dieser Aufreinigung wurde mit gleicher Methode, als Negativkontrolle, der Stamm HLCP (*PCK1p* ohne *EFG1*) ebenfalls aufgereinigt. Das gesamte Volumen der Probe wurde in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

In Abb. 41 ist zu sehen, dass das Bandenprofil der beiden Proben nahezu identisch ist. Nur auf der Höhe zwischen 98 kDa und 64 kDa konnte eine intensiv blaugefärbte Bande gesichtet werden, die bei der HLCP-Probe nur sehr schwach ausgeprägt ist. Diese Bande wurde anschließend massenspektroskopisch untersucht. In Datenbank-Analysen konnten alle sieben Peptide dem CaSsa4-Hitzeschockprotein zugeordnet werden (Tab. 6). Somit scheint eine fünffache Vergrößerung des Versuchsansatzes nicht ausreichend zu sein, um das Efg1p-Protein in ausreichender Menge zu isolieren. Aus diesem Grund scheint es ebenso unwahrscheinlich, durch diese Methode die Interaktionspartner von Efg1p zu isolieren, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit in ähnlicher Konzentration in der Zelle auftreten.

In Abb. 41 ist zu sehen, dass das Bandenprofil der beiden Proben nahezu identisch ist. Nur auf der Höhe zwischen 98 kDa und 64 kDa konnte eine intensiv blaugefärbte Bande gesichtet werden, die bei der HLCP-Probe nur sehr schwach ausgeprägt ist. Diese Bande wurde anschließend massenspektroskopisch untersucht.

In Datenbank-Analysen konnten alle sieben Peptide dem CaSsa4-Hitzeschockprotein zugeordnet werden (Tab. 6). Somit scheint eine fünffache Vergrößerung des Versuchsansatzes nicht ausreichend zu sein, um das Efg1p-Protein in ausreichender Menge zu isolieren. Aus diesem Grund scheint es ebenso unwahrscheinlich, durch diese Methode die Interaktionspartner von Efg1p zu isolieren, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit in ähnlicher Konzentration in der Zelle auftreten.

**Tab. 6: Massenspektroskopisch identifizierte Peptid-Sequenzen.**

Masse	Sequenz	Protein
464,30	KFDDPEVINDAK	70 kDa Hitzeschockprotein Ssa4p
559,30	ATAGDTHLGGEDFDNR	“
592,30	FELSGIPPAPR	“
600,40	DAGTIAGLNVLRL	“
633,90	EIAEGYLGSTVK	“
642,90	LVNFFIQEFK	“
736,40	TTPSFVAFTDTER	“

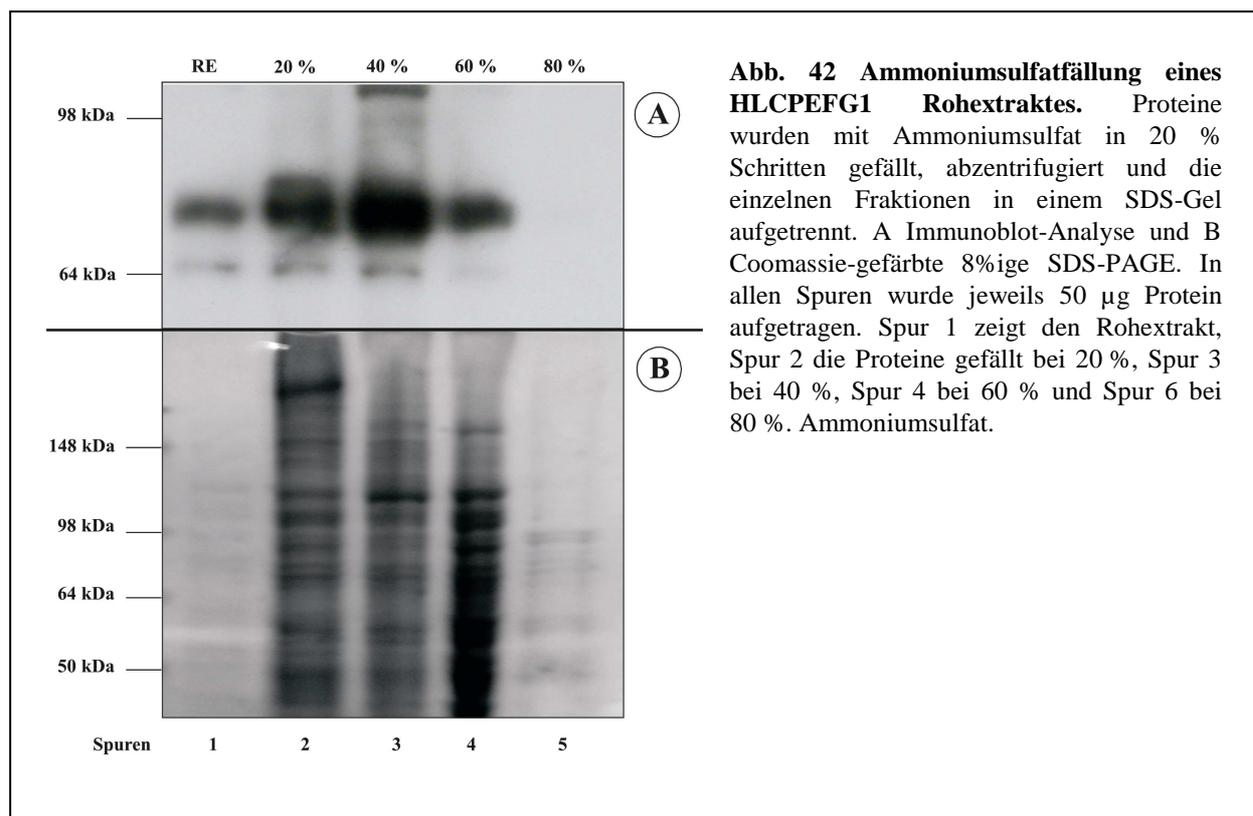
### 3.6 Vorversuche zu Reinigungsmöglichkeiten für Efg1p

Auf Grund der Schwierigkeiten, Efg1p in einer größeren Menge aus einem Rohextrakt über eine HA-Affinitätsmatrix zu reinigen, wurden andere Reinigungsschritte in Betracht gezogen, um Efg1p zu konzentrieren. Mit dieser Methode können möglicherweise in den ersten Reinigungsschritten größere Mengen an überflüssigen Proteinen entfernt und gleichzeitig Efg1p konzentriert werden. Dadurch könnte im spezifischen Reinigungsschritt mit der HA-Affinitätschromatographie eine größere und reinere Efg1p-Fraktion auf die Säule aufgetragen werden. Die einzelnen Schritte dieser Reinigung sollten aus einem Anionen- und Kationenaustauscher bestehen, um eine grobe „Vorreinigung“ des Rohextraktes vorzunehmen. Anschließend sollte das Efg1-Protein spezifisch über zwei Epitope aufgereinigt werden. Für dieses Aufreinigungssystem wurden in dieser Arbeit Vorversuche durchgeführt.

#### 3.6.1.1 Ammoniumsulfatfällung

Diese Fällungsmethode wird angewendet, um bestimmte Proteine in einer Fraktion zu sammeln und anzureichern. Die Ammoniumsulfatfällung beruht auf den unterschiedlichen Löslichkeitsprodukten der einzelnen Proteine. Die Vorteile dieser reversiblen Fällungsmethode liegen darin, dass die biologische Aktivität von empfindlichen Proteinen erhalten bleibt und das Ammoniumsulfat leicht durch Dialyse oder Ionenaustauscher entfernt werden kann (Zorbas, 1998). Mit dieser Methode sollte als erstes eine grobe Efg1p-Reinigung von den restlichen Proteinen des Rohextraktes erreicht werden. Bevorzugt präzipitieren Proteine bei Konzentrationen zwischen 40 % und 60 %. Mit den Fällungsschritten durch 20 %, 40 %, 60 % und 80 % Ammoniumsulfat sollte zunächst untersucht werden, bei welcher Ammoniumsulfat-Konzentration Efg1p präzipitiert. Für diesen Versuch wurde der *C. albicans* Stamm HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) in 1 l SCAA-Medium angezogen und es wurde von diesen Zellen Rohextrakte isoliert. Das Rohextrakt-Volumen wurde bestimmt und die errechnete Menge an gesättigtem Ammoniumsulfat unter stetigem Rühren auf Eis tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung weitere 20 min auf Eis unter Rühren inkubiert. Um die gefällten Proteine zu pelletieren wurde diese Lösung zentrifugiert und das Sediment in 1 ml *Candida*-Lyse-Puffer aufgenommen (2.7.12). Der Überstand wurde für die nächste Fällung verwendet. Auch hier wurde wieder das Volumen des Überstandes ermittelt. Anschließend wurden 50 µg Protein von

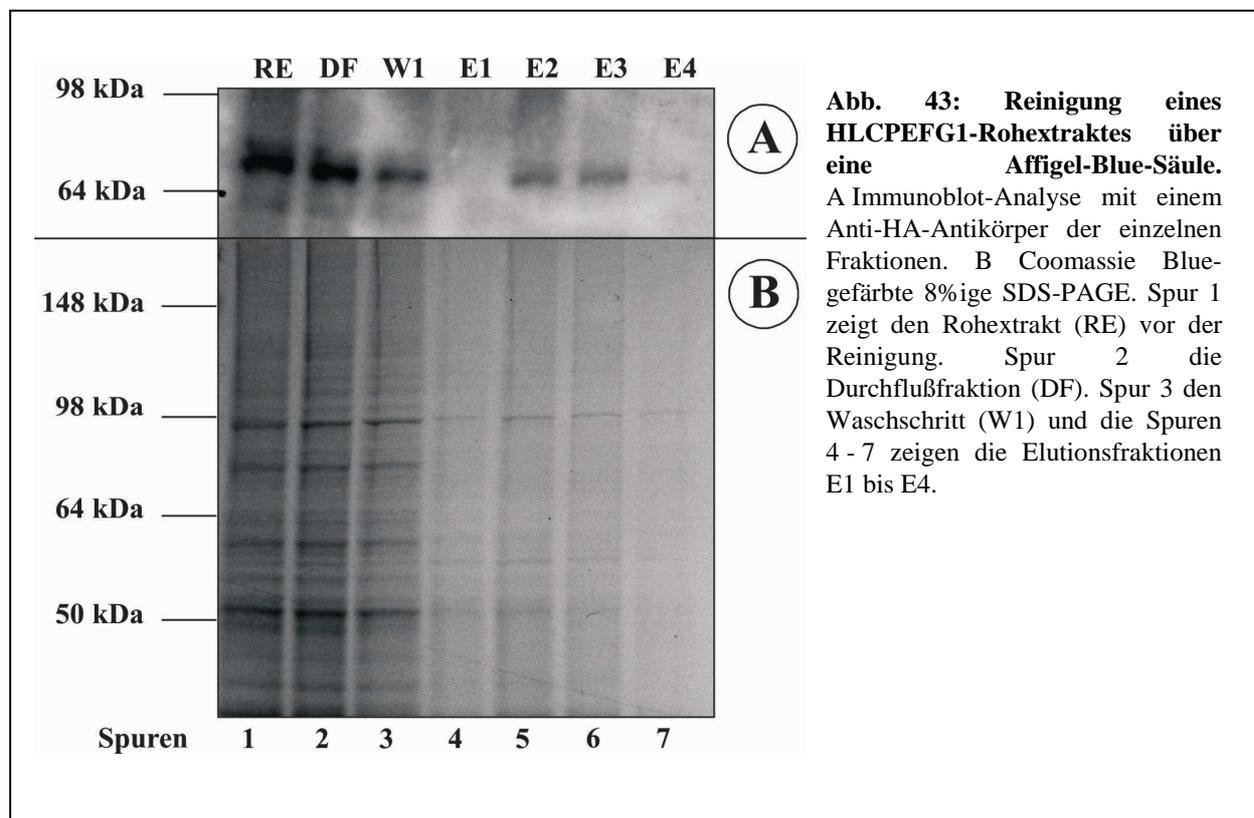
jeder Fraktion und dem Rohextrakt, in zwei separaten Tris/Glycin-Gelen aufgetrennt. Das erste Gel wurde durch Immunoblot analysiert, während das zweite Gel mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt wurde. Abb. 42 A kann entnommen werden, dass eine Konzentrierung des Efg1-Proteins stattgefunden hat, da das Signal des Efg1-Proteins im Rohextrakt (RE) wesentlich schwächer ist, als in den Sedimentfraktionen mit den Ammoniumsulfatkonzentrationen 20 % bis 60 %. Efg1p lässt sich jedoch nicht bei einer definierten Ammoniumsulfatkonzentration isolieren. Es präzipitiert vielmehr im Bereich von 20 – 40 % (Optimum bei 40 % Ammoniumsulfat). Somit ist eine signifikante Reinigung von Efg1p mit dieser Methode nicht gewährleistet.



### 3.6.1.2 Affigel-Blue-Säule

Als eine weitere Reinigungsmethode wurde die Affigel-Blue-Säule in Betracht gezogen. Diese Matrix besteht aus kovalent an Agarose gebundenem Cibaron® Blue F3GA Farbstoff, welcher ein breites Spektrum an Proteinen bindet. Dieser Farbstoff kann sowohl als ionische, hydrophobe, aromatische oder als sterisch-aktive Matrix dienen. Auf Grund dieser vielfältigen Eigenschaft dieser Matrix wurde untersucht, ob Efg1p über dieses Säulensystem gereinigt werden kann. Der Stamm HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) wurde in 1 l SCAA-Medium angezogen, geerntet und aufgeschlossen. Eine 1 ml Bettvolumen-Säule wurde mit 5 ml *Candida*-Lysepuffer äquilibriert und mit dem Rohextrakt beladen. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml *Candida*-Lysepuffer gewaschen und mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl) eluiert. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und von jeder Fraktion 20 µg Protein in zwei Gelen aufgetrennt. Das Efg1-Protein wurde mittels Immunoblot detektiert und die Gesamtprotein-Verteilung in einem Coomassie Brilliant Blue-gefärbten Gel fotografisch festgehalten.

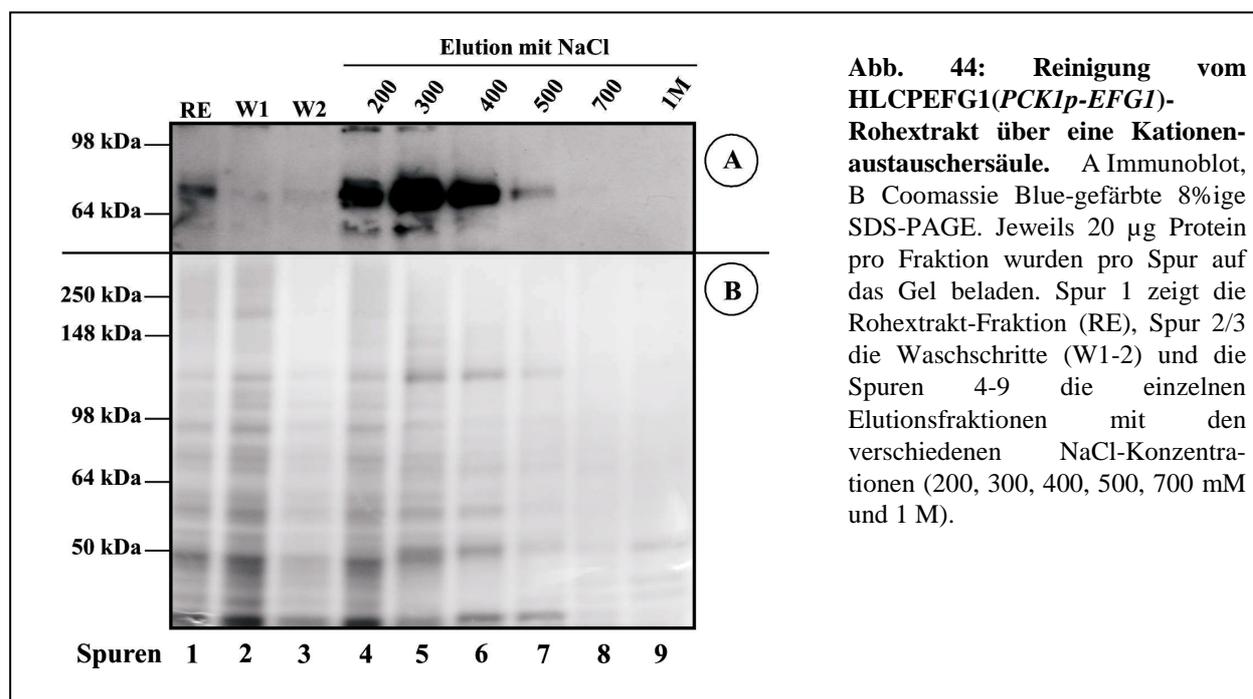
In Abb. 43 ist in (A) der Immunoblot dieser Aufreinigung zu sehen. Efg1p bindet offenbar nur sehr schwach und unspezifisch an die Säule, da eine große Menge Efg1p in der Durchflußfraktion und in der Waschfraktion detektierbar ist. Des Weiteren kann Efg1p nur in geringen Konzentrationen eluiert werden. Dieses Säulensystem ist aus diesen Gründen nicht für die Isolierung von Efg1p einsetzbar.



### 3.6.1.3 Aufreinigung über eine Kationenaustauschersäule

Efg1p ist mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 9,6 ein stark basisches Protein. Aus diesem Grund wurde für eine Reinigung des Efg1-Proteins ein starker Kationenaustauscher mit einem Bettvolumen von 1 ml (GE Healthcare SP FF-Säule) gewählt. Dafür wurde der Stamm HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) in 1 l SCAA-Medium angeimpft. Der Rohextrakt dieser Kultur wurde mit 1 M NaOH-Lösung auf einen pH zwischen 8,0 und 8,5 eingestellt, um eine möglichst große Trennung zwischen Efg1p und anderen Proteinen mit niedrigeren pI-Werten zu erhalten. Ist der pH-Wert einer Lösung oberhalb vom pI-Wert eines Proteins, so hat dieses eine negative Gesamtladung. Das hieße in diesem Fall, dass alle Proteine mit einem pI unterhalb von 8,0 eine negative Gesamtladung hätten und damit nicht an die Kationenaustauschersäule binden könnten. Somit könnte mit dieser Methode ein Großteil der Proteine im Rohextrakt vom Efg1-Protein getrennt werden. Mit diesem leicht basischen Rohextrakt wurde eine 1 ml Kationenaustauschersäule beladen und mit 5 ml *Candida*-Lyse-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurde mit einem Stufengradienten eluiert. Als Ausgangslösung für den Gradienten diente der *Candida*-Lyse-Puffer (pH 8,0), der eine Salzkonzentration von 150 mM NaCl besaß. Der Elutions-Gradient bestand aus 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 700 mM und 1 M NaCl-Konzentration. Für die Elution wurde jeweils 1 ml pro Gradient eingesetzt. Jeweils 20 µg Protein wurden von jeder Fraktion in zwei Tris/Glycin-Gele aufgetrennt und Efg1p in einem

Immunoblot detektiert. Zur groben Übersicht der Proteinverteilung wurde ein Gel mit Coomassie angefärbt.



**Abb. 44: Reinigung vom HLCPEFG1(*PCK1p-EFG1*)-Rohextrakt über eine Kationenaustauschersäule.** A Immunoblot, B Coomassie Blue-gefärbte 8%ige SDS-PAGE. Jeweils 20 µg Protein pro Fraktion wurden pro Spur auf das Gel beladen. Spur 1 zeigt die Rohextrakt-Fraktion (RE), Spur 2/3 die Waschschritte (W1-2) und die Spuren 4-9 die einzelnen Elutionsfraktionen mit den verschiedenen NaCl-Konzentrationen (200, 300, 400, 500, 700 mM und 1 M).

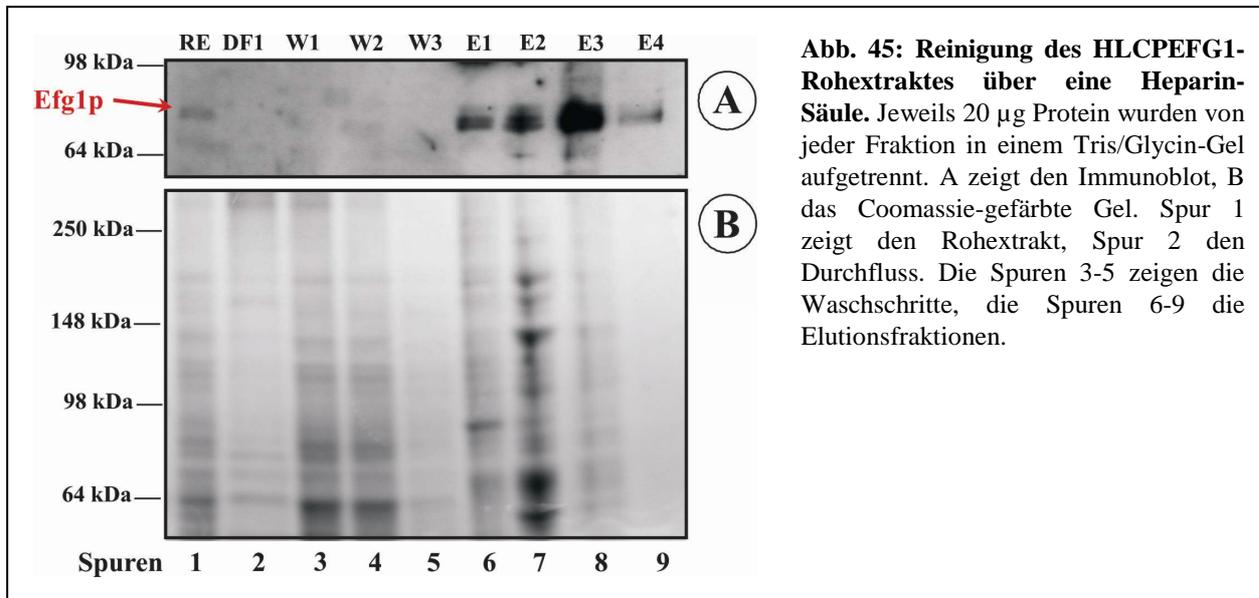
Aus Abb. 44 kann entnommen werden, dass mit dieser Reinigungsmethode eine Konzentrierung von Efg1p möglich ist. Das gewünschte Protein ist in relativ großer Menge in den Fraktionen 200, 300 und 400 mM NaCl im Immunoblot (A) nachweisbar, wobei Efg1p offenbar bevorzugt in der 300 mM NaCl-Fraktion eluiert wird. Parallel zu diesen Fraktionen ist Efg1p in geringer Menge ebenfalls in der 500 mM NaCl-Fraktion detektierbar. Um mit dieser Methode einen großen Verlust an Efg1p zu vermeiden, könnte bei einer Isolierung über diese Säule eine direkte Eluierung mit einem 400 mM NaCl-Puffer erfolgen.

### 3.6.1.4 Heparin-Säule

Efg1p reguliert die Expression verschiedener Gene, indem es an Konsensus-Sequenzen wie das MCB-Element oder E-Box in Promotorbereichen bindet (Doedt, 2004; Hilbig, 2004; Bußmann, 2006). Wegen dieser DNA-bindenden Eigenschaft von Efg1p wurde eine Isolierung durch eine Heparin-Säule in Betracht gezogen. Heparin ist ein Polyanion und imitiert gewissermaßen die DNA mit ihrem negativen Phosphat-Rückgrat. Proteine, die an die DNA binden, binden durch elektrostatische Interaktion ebenfalls an die Heparin-Säule.

Um zu untersuchen, wie sich das Efg1-Protein bei der Heparin-Reinigung verhält, wurde der Stamm HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) in 1 l SCAA-Medium angezogen und aus Zellen dieser Kultur der Rohextrakt isoliert. Anschließend wurde der Rohextrakt mit 1 M NaOH-Lösung auf einen pH von 8 eingestellt. Diese Protein-Suspension wurde auf eine Heparin-Agarose Typ I Säule der Firma Sigma mit einem Bettvolumen von 2,5 ml geladen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Rohextrakt-Konzentration nicht über 10 mg/ml lag, um eine Überladung der Säule zu vermeiden. Nach einem Waschschritt mit 20 ml Equilibrierungspuffer wurde mit einem Hochsalz-Puffer in 1 ml Schritten eluiert. 20 µg Protein von jeder 1 ml Fraktion und von dem Rohextrakt wurden in zwei SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot oder Coomassie-Färbung analysiert.

Wie man aus der Abb. 45 entnehmen kann, ist im Immunoblot (A) eine sehr schwache Efg1p Bande im Rohextrakt zu sehen, welche nach der Reinigung intensiviert wird. In den Fraktionen E1, E2 und E4 sind Efg1p Signale vorhanden, die jedoch relativ zur E3-Fraktion gering sind. Des Weiteren ist im Coomassie Brilliant Blue-gefärbten SDS-Gel (B) zu sehen, dass in den Fraktionen E1 und E2 relativ viele Proteine eluieren, während in der nächsten E3-Fraktion verhältnismäßig wenig Proteine eluiert werden. Aus diesen Gründen scheint die Heparin-Säule für eine Reinigung von Efg1p geeignet zu sein.

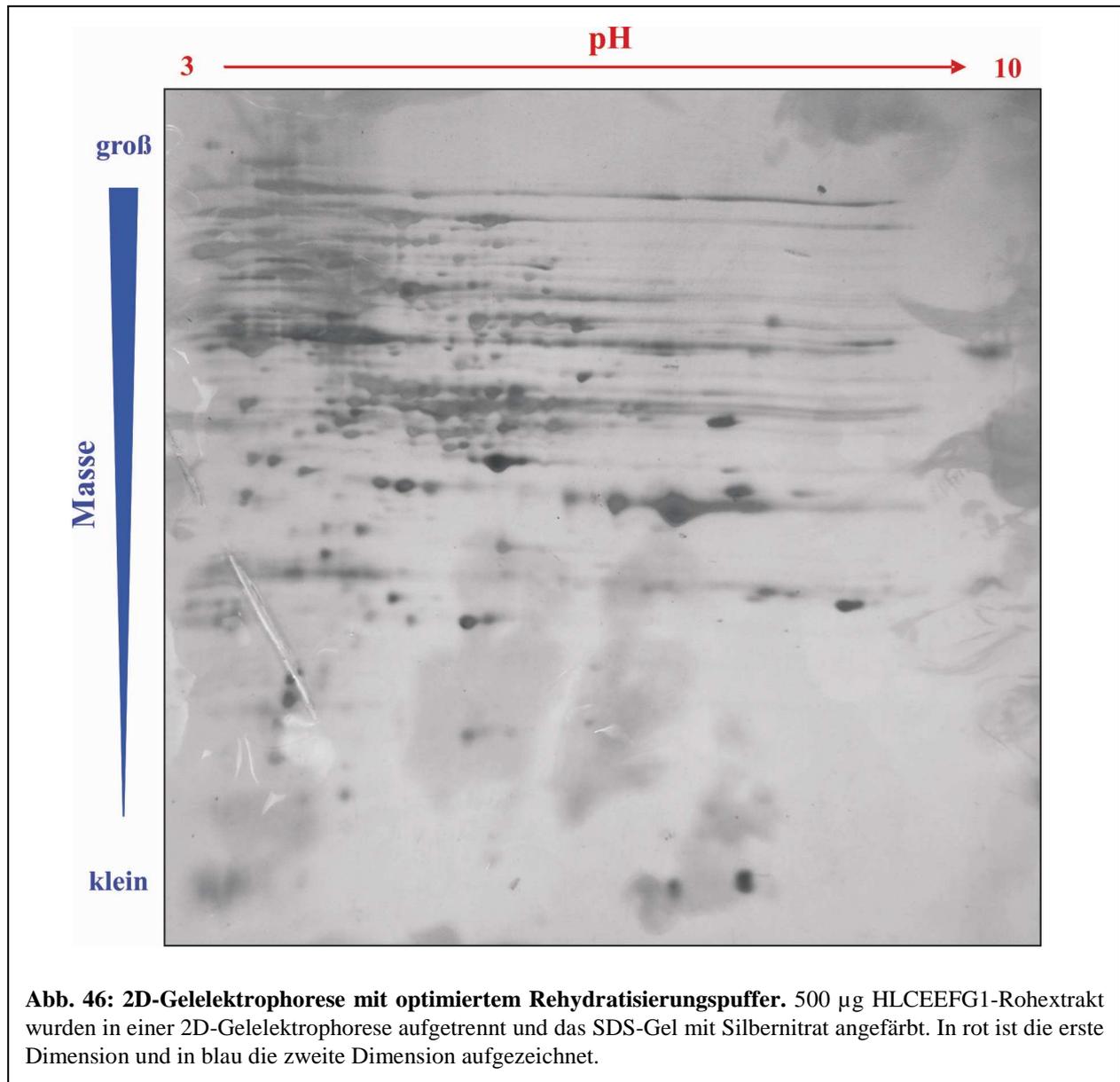


**Abb. 45: Reinigung des HLCPEFG1-Rohextraktes über eine Heparin-Säule.** Jeweils 20 µg Protein wurden von jeder Fraktion in einem Tris/Glycin-Gel aufgetrennt. A zeigt den Immunoblot, B das Coomassie-gefärbte Gel. Spur 1 zeigt den Rohextrakt, Spur 2 den Durchfluss. Die Spuren 3-5 zeigen die Waschschritte, die Spuren 6-9 die Elutionsfraktionen.

### 3.6.2 2D-Gelelektrophorese

Neben den Versuchen, optimale Reinigungssysteme für Efg1p und seinen potentiellen Interaktionspartnern zu finden, wurde unter anderem auch eine Auftrennung der Proteine über 2D-Gelelektrophorese untersucht. Diese Methode beruht auf der Trennung von Proteinen in zwei verschiedenen Schritten. Der erste Teil (erste Dimension) beruht auf der Auftrennung der Proteine über die isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI). In diesem Schritt müssen möglichst alle Proteine (sauerer, basischer, hydrophiler, hydrophober, Membranproteine etc.) solubilisiert und sich in einem relativ salzfreien Medium (<100 mM) befinden (Görg *et al.*, 2004). Dies ist ein sehr wichtiger Faktor, da sonst unnötige Ionen die Mobilität der Proteine verhindert bzw. stört. Der zweite Teil (zweite Dimension) ist die Trennung der Proteine über ihre Masse in einem Polyacrylamidgel.

Für die Auftrennung von Efg1p wurden Rohextrakte aus HLCPEFG1 (*PCK1p-EFG1*) präpariert. Jeweils 500 µg bis 1 mg Protein wurden für die IEF eingesetzt. Um die hohe Salzkonzentration (150 mM NaCl) im *Candida*-Lysepuffer, der für die Rohextrakt Herstellung verwendet wurde, zu entfernen, wurde der Rohextrakt zunächst mit Aceton gefällt und anschließend in Rehydratisierungspuffer aufgenommen. Der Rehydratisierungspuffer wurde zunächst nach den Angaben des Herstellers (Amersham) hergestellt. In der Regel besteht ein Rehydratisierungspuffer aus einem Chaotrop, einem oder mehreren Detergenzien, einer reduzierenden Substanz und dem IPG-Puffer (Träger-Amopholyte). Das Chaotrop dient dazu die Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen zu lösen und diese somit zu denaturieren. Die Detergenzien sind für die Verhinderung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteindomänen nötig. Dadurch wird eine Aggregatbildung und ein Ausfallen verhindert. Hierbei ist es wichtig, ein Detergenz zu wählen, das entweder zwitterionisch oder nichtionisch ist, da sonst ebenfalls eine Wanderung im elektrischen Feld erfolgt und die Proteine ausfallen könnten. In der Regel verwendet man Detergenzien wie CHAPS, ASB14 und SB3-10 (Görg *et al.*, 2004). Weitere wichtige Komponente sind die Reduktionsmittel, die für die Oxidation von Disulfidbrücken in den Proteinen für die vollständige Entfaltung wichtig sind. Der Rehydratisierungspuffer von Amersham bestand aus 8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,5 % IPG-Puffer, 2,8 mg/ml DTT und 0,002 % Bromphenolblau. Nach einer Testphase wurde die Zusammensetzung auf 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 2 % ASB-14 verändert. Mit diesem Puffer wurde eine relativ gute Auflösung im sauren Bereich erzielt. Eine gute Auflösung in der 2D-Gelelektrophorese zeichnet sich durch einzelne Proteinpunkte („Spots“) aus. Aus Abb. 46 kann man jedoch entnehmen, dass zwar im sauren Bereich einzelne Proteinpunkte zu sehen sind, diese aber im basischen Bereich immer weniger werden. Efg1p hat jedoch einen sehr stark basischen isoelektrischen Punkt (pI) von 9,6. In diesem Bereich ist die Auftrennung der einzelnen Proteine bei der IEF fehlgeschlagen. Es sind nur vermindert Proteine detektierbar, die aber nicht zu einem „Spot“ konzentriert werden konnten, vielmehr ist ein „Schmier“ in der ersten Dimension zu sehen.

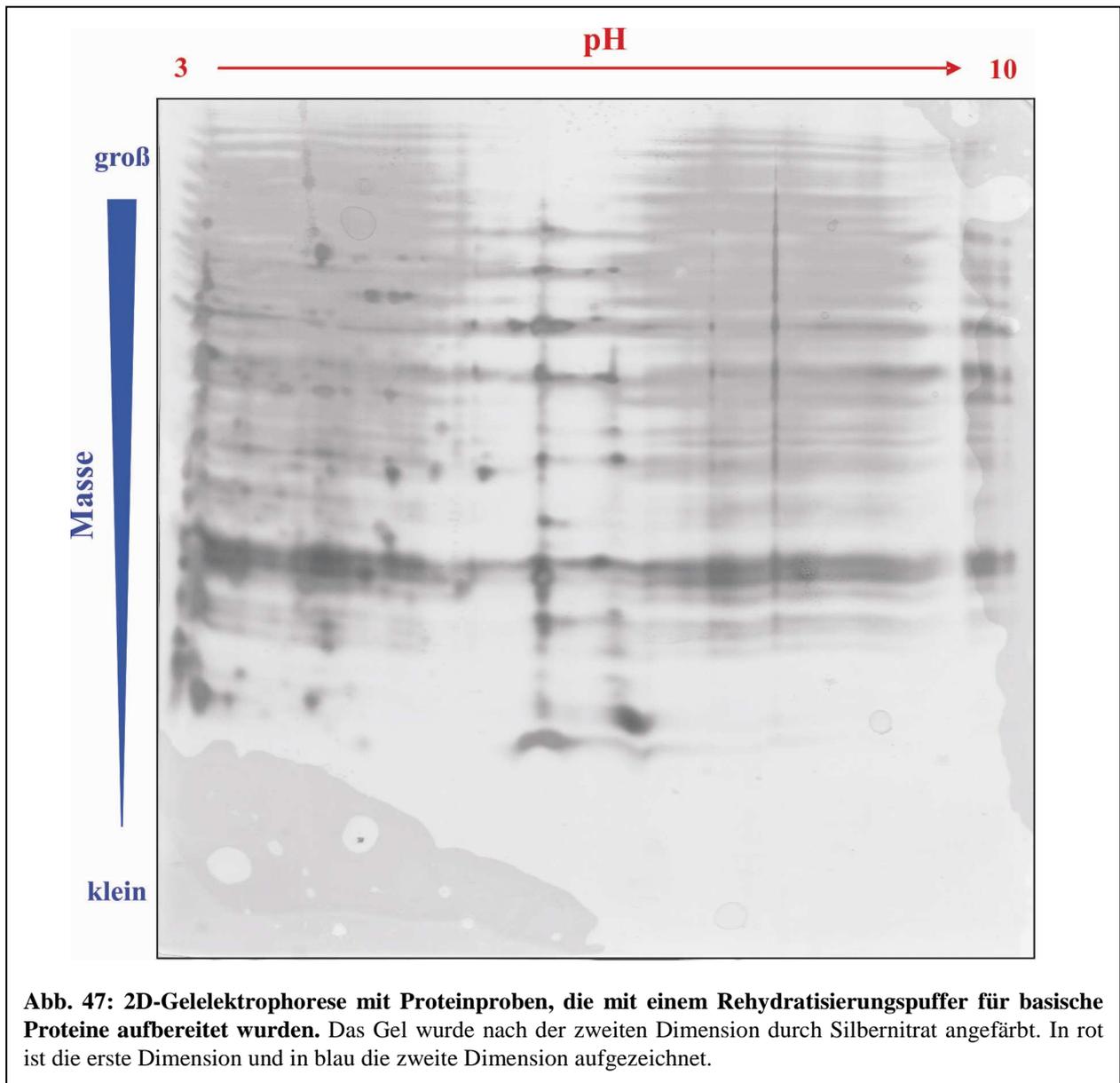


Jede Gelmatrix besitzt eine Ladung, die beim Anlegen eines elektrischen Feldes ebenfalls wandert und den elektroosmotischen Fluss (EOF) des gesamten wässrigen Mediums erzeugt. Durch diesen Fluss wird bevorzugt im basischen Bereich ein „Schmier“ der „Spots“ verursacht. Um diesen Effekt vorzubeugen wurde ein modifizierter Rehydratisierungspuffer für basische Proteine verwendet (Hoving *et al.*, 2002). Dieser Puffer bestand aus 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 2,5 % DTT, 10 % Isopropanol, 5 % Glycerol und 2 % IPG-Puffer. Das Isopropanol wirkt gegen die Elektroosmose (EOF) der Gelmatrix (Gorg *et al.*, 1997). Durch die Zugaben von Glycerol wird die Gelmatrix flexibler und beugt so dem Effekt weiter vor (Hoving *et al.*, 2002). Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Auftrennung von basischen Proteinen in der 2D-Gelelektrophorese ist die Konzentration von DTT. Dieses Reduktionsmittel ist im basischen Bereich entprotoniert und negativ geladen, so dass es zur Anode wandert. Dies hat zur Folge, dass DTT nur noch gering im kathodischen Bereich vorhanden ist, die Proteine neue Disulfidbrücken bilden und dadurch nicht mehr in Lösung sind (Gorg *et al.*, 2000). Aus diesem

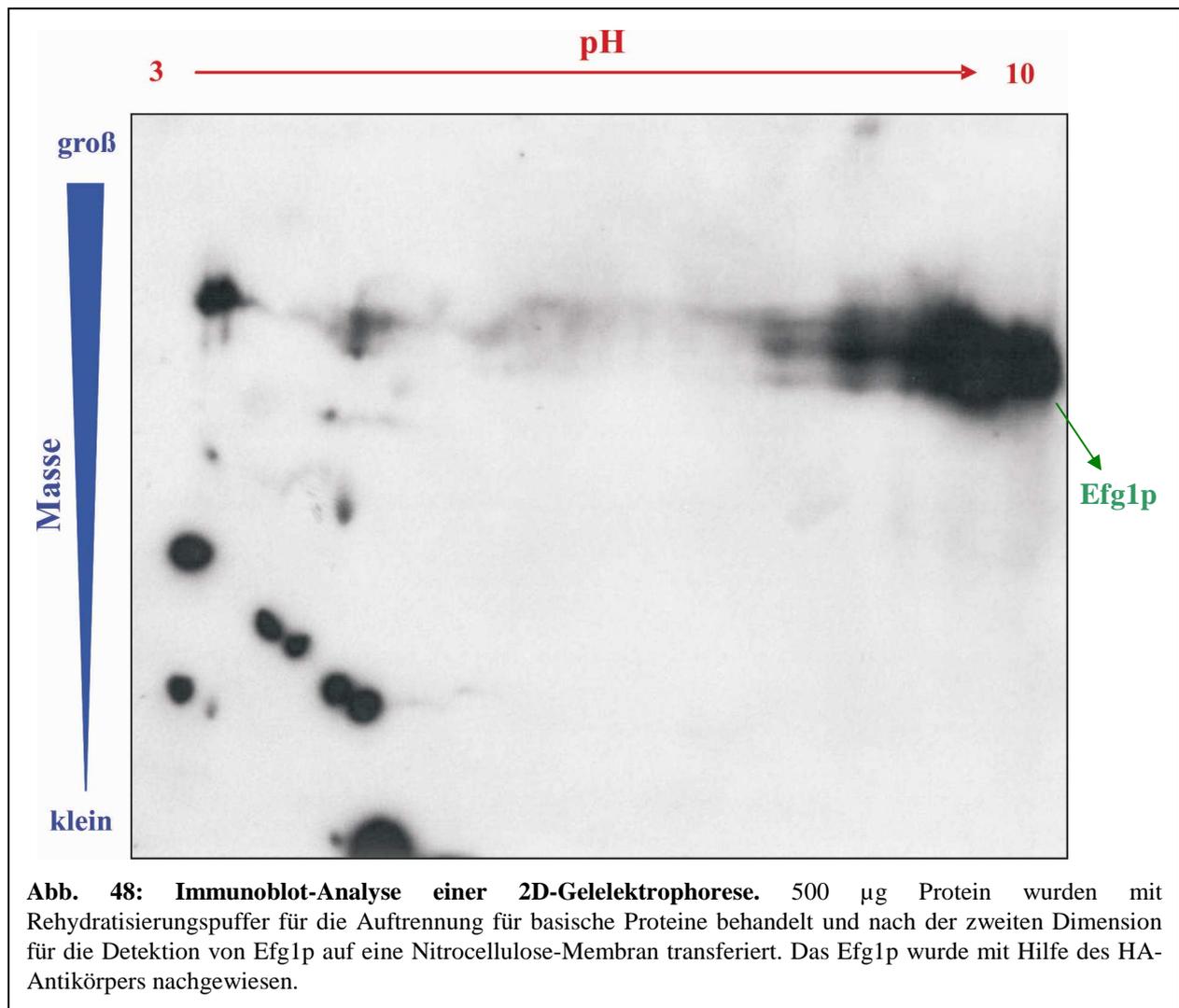
Grund wurde diesem speziellen Rehydratisierungspuffer eine größere Menge an DTT zugegeben.

Der positive Effekt von diesem Rehydratisierungspuffer ist in Abb. 47 zu sehen. Es sind wesentlich mehr Proteine im basischen Bereich detektierbar. Jedoch konnte die Verzerrung der Signale in der ersten Dimension nicht verbessert werden. Auch scheinen die Signale überladen zu sein, so dass für die nächsten Auftrennungen weniger Proteine aufgetragen werden sollte.

Eine weitere 2D-Gelelektrophorese wurde nach der zweiten Dimension auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und das Efg1p immunologisch detektiert.



**Abb. 47: 2D-Gelelektrophorese mit Proteinproben, die mit einem Rehydratisierungspuffer für basische Proteine aufbereitet wurden.** Das Gel wurde nach der zweiten Dimension durch Silbernitrat angefärbt. In rot ist die erste Dimension und in blau die zweite Dimension aufgezeichnet.

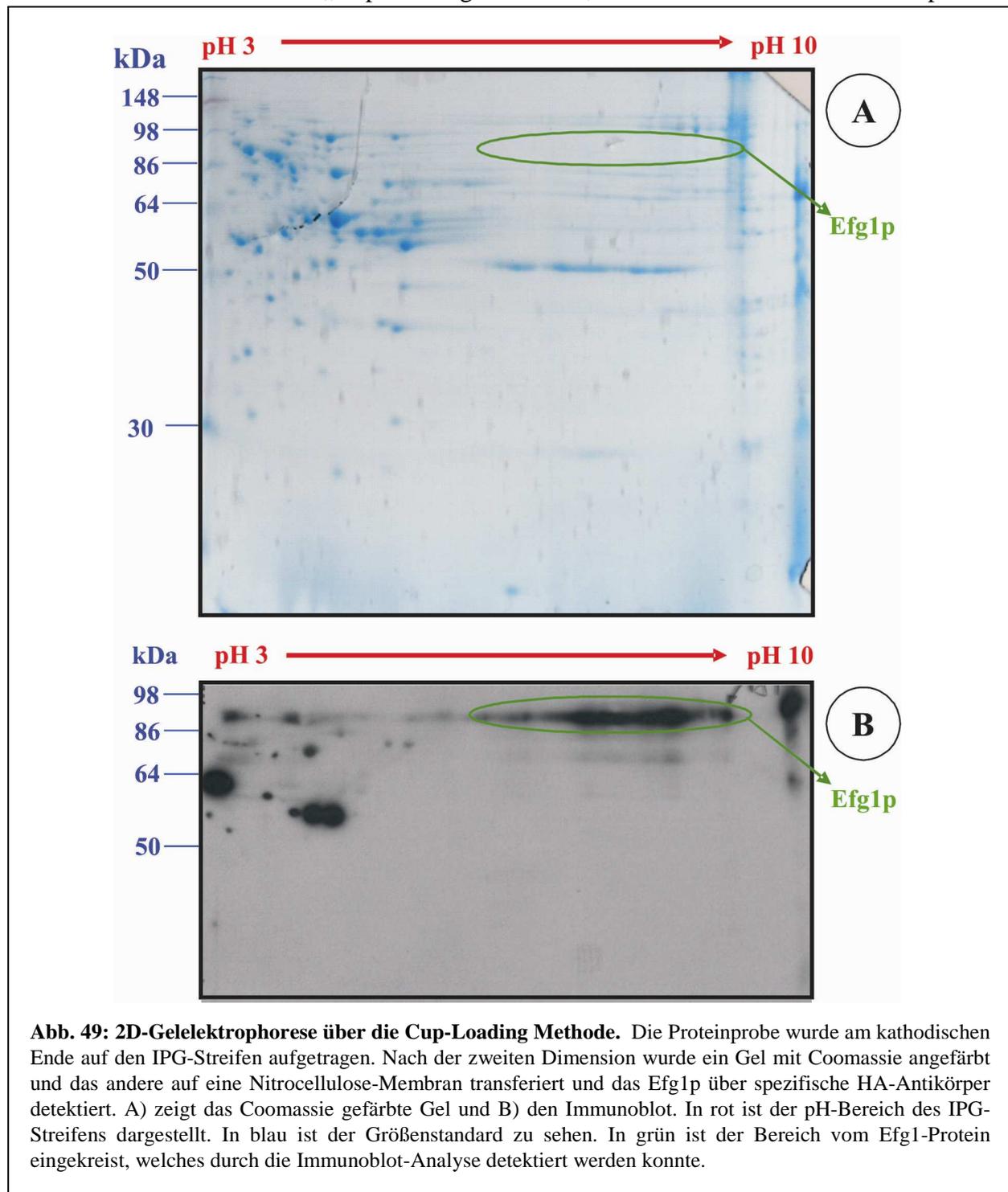


**Abb. 48: Immunoblot-Analyse einer 2D-Gelelektrophorese.** 500  $\mu\text{g}$  Protein wurden mit Rehydratisierungspuffer für die Auftrennung für basische Proteine behandelt und nach der zweiten Dimension für die Detektion von Efg1p auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das Efg1p wurde mit Hilfe des HA-Antikörpers nachgewiesen.

Aus Abb. 48 kann entnommen werden, dass das Efg1p als dreifach-Bande im basischen Bereich detektierbar ist, aber nicht zu einem „Spot“ konzentriert werden konnte.

Um die Auftrennung im basischen Bereich weiter zu optimieren, wurde zusätzlich untersucht, ob eine Alkylierung der Cystein-Reste, vor der ersten Dimension durch Acrylamid, eine Optimierung der Trennung hervorruft. (Khoudoli *et al.*, 2004). Diese Alkylierung ist nicht reversibel, so dass während der IEF keine Disulfidbrücken gebildet werden können. Dadurch wäre eine Zugabe von DTT überflüssig. Für diese Alkylierung wurde der rehydratisierten Probe, vor der IEF, 4 % reines Acrylamid hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Auch diese Maßnahme führte allerdings zu keiner Verbesserung der Probenauftrennung (Daten nicht gezeigt).

Eine häufig angewendete Methode, um Proteine im basischen Bereich aufzutrennen, ist die so genannte „Cup-Loading“ Methode (Gorg *et al.*, 2000). Bei dieser Technik werden die Proben an einem spezifischen Punkt auf die Gelmatrix der ersten Dimension aufgetragen. Bei den gängigen Auftragemethoden werden die Proben in Rehydratisierungspuffer über Nacht mit dem IPG-Streifen inkubiert. Dies führt dazu, dass die Gelmatrix am Streifen aufquillt und so gleichzeitig die Probe aufnimmt. Bei der „Cup-Loading“ Methode, wird der Streifen ohne Proteinprobe in



**Abb. 49: 2D-Gelelektrophorese über die Cup-Loading Methode.** Die Proteinprobe wurde am kathodischen Ende auf den IPG-Streifen aufgetragen. Nach der zweiten Dimension wurde ein Gel mit Coomassie angefärbt und das andere auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und das Efg1p über spezifische HA-Antikörper detektiert. A) zeigt das Coomassie gefärbte Gel und B) den Immunoblot. In rot ist der pH-Bereich des IPG-Streifens dargestellt. In blau ist der Größenstandard zu sehen. In grün ist der Bereich vom Efg1-Protein eingekreist, welches durch die Immunoblot-Analyse detektiert werden konnte.

Rehydratisierungspuffer inkubiert und die Probe punktuell aufgetragen. Bei der Problematik in dieser Arbeit lag es nahe, die Probe im stark basischen Bereich, an der Kathode aufzutragen. Da Efg1p, mit seinem sehr stark basischen pI von 9,6 am Ende des Streifens fokussieren müsste,

wurde angenommen, dass eine Fokussierung in der geeigneten pH-Region sich positiv auf das Laufverhalten auswirkt.

Die Proteinproben wurden mittels „Cup-Loading“ am kathodischen Ende aufgetragen und über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden zwei Auftrennungen durchgeführt, um ein Immunoblot und eine Coomassie-Färbung durchzuführen. Das Ergebnis ist in Abb. 49 zu sehen. Obwohl Efg1p im Bereich seines eigenen pI-Wertes aufgetragen wurde, konnte keine Verbesserung der Fokussierung im basischen Bereich erzielt werden. Im Immunoblot (B) ist ersichtlich, dass Efg1p in dem Bereich zwischen pH 5 und pH 10 wandert. Im Coomassie gefärbten Gel (A) ist zu sehen, dass der horizontale „Schmier“ im basischen Bereich auch durch die spezielle Proben-Beladungsmethode nicht behoben werden konnte.

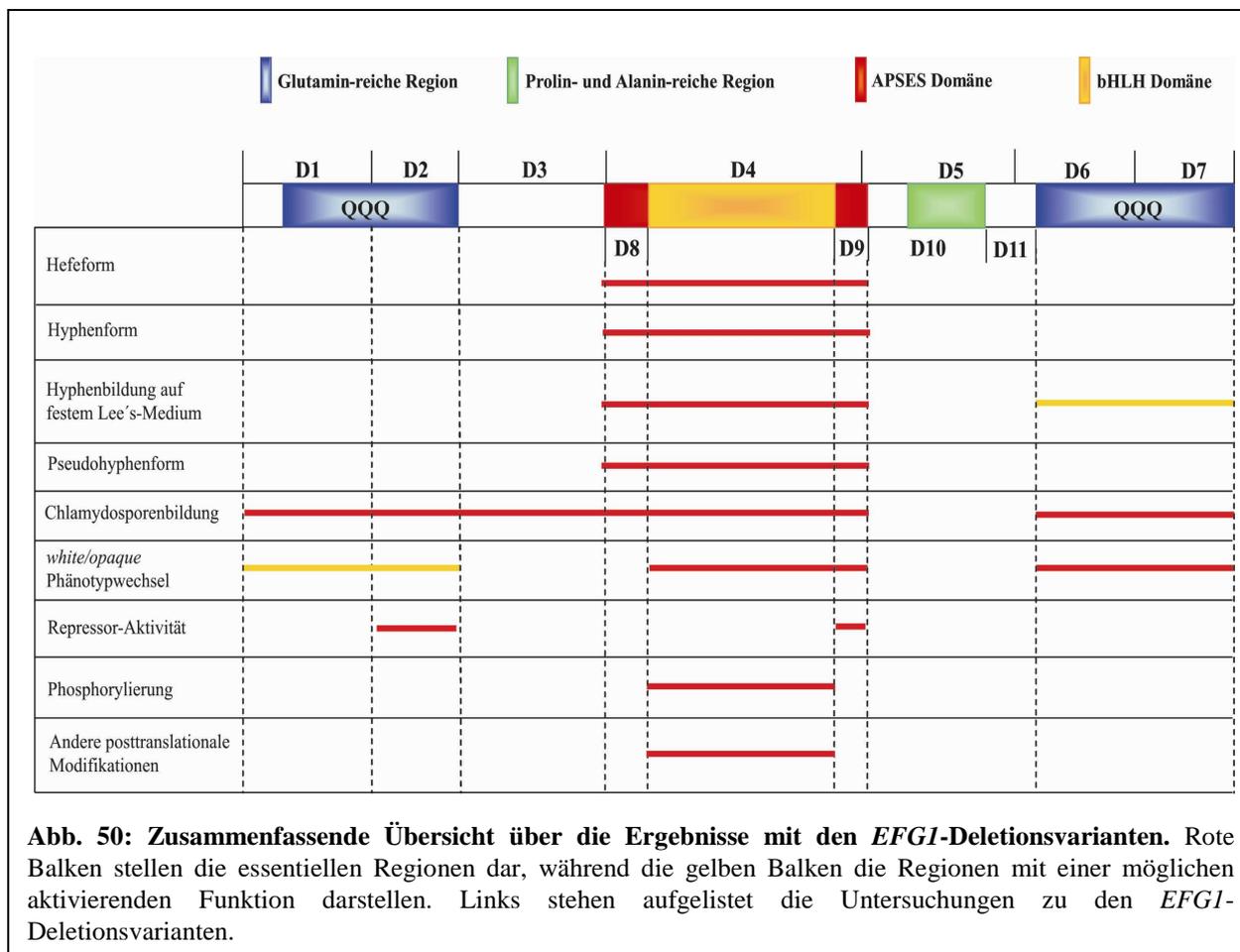
Auf Grund der Schwierigkeiten, in einer 2D-Gelelektrophorese Proteine im basischen Bereich aufzutrennen, erscheint daher diese Methode als nicht geeignet, um Efg1p zu isolieren.

## 4 Diskussion

Der humanpathogene Pilz *C. albicans* ist ein Kommensale des gesunden Menschen und stellt nur bei Immunschwäche eine ernsthafte Gefahr für den Menschen dar; er löst dann oberflächliche und systemische Mykosen aus (Odds, 1994). *C. albicans* besitzt die Fähigkeit, verschiedene Morphologien ausbilden zu können, die für die Virulenz entscheidend sind. Besonders wichtig ist hierbei der Dimorphismus, der Wechsel zwischen Hefe und filamentöser Form, ohne den *C. albicans* avirulent wäre (Lo *et al.*, 1997). Die Hefeform ist für die Verbreitung im menschlichen Körper über den Blutstrom wichtig (Cutler, 1991) und die Hyphenform mit den assoziierten Virulenzfaktoren (Kumamoto und Vines, 2005) für die Adhäsion an und Penetration in Epithelien (Calderone und Braun, 1991; Sherwood *et al.*, 1992). Aber auch alle weiteren Phänotypen, wie z. B. Bildung von Chlamydosporen und der spontane Phänotypwechsel zwischen *white*- und *opaque*-Zellen, tragen möglicherweise zur Virulenz bei. Sowohl die morphologischen Prozesse, als auch die Induktion von Virulenzfaktoren werden durch den Transkriptionsfaktor Efg1p reguliert (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999a; Sonneborn *et al.*, 1999b; Vines *et al.*, 2006), wodurch die Funktion von Efg1p als globaler Regulator von *C. albicans* deutlich wird. Dieses Protein, welches zu den APSES-Proteinen gezählt wird, besitzt eine 100 AS-umfassende, hochkonservierte APSES-Domäne, in die ein bHLH-Bindemotiv eingebettet ist. Die Regulation der Aktivität von Efg1p ist weitestgehend ungeklärt. Bisher wurden drei Interaktionspartner identifiziert (Sin3p, Czf1p und Flo8p) (Brown *et al.*, 1999; Doedt *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006; Vines *et al.*, 2006). Unklar bleibt, welche Zielsequenzen von Efg1p gebunden und welche Zielgene direkt von Efg1p reguliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionelle Domänen des Efg1-Proteins für die verschiedenen morphologischen Vorgänge, für die regulatorische Aktivität und für die Modifizierung aufgeklärt. Auch konnte eine direkte Bindung von Efg1p an eine E-Box Sequenz im eigenen Promotor nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden Vorversuche unternommen, um Efg1p und mögliche Interaktionspartner zu isolieren und zu charakterisieren.

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der *EFG1*-Deletionsvarianten



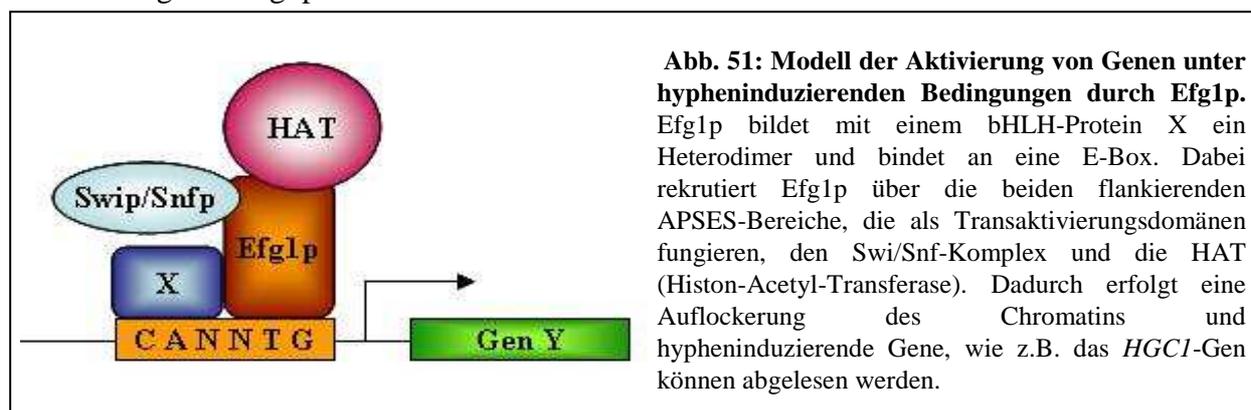
In Abb. 50 sind die Ergebnisse der *EFG1*-Deletionsvarianten zusammenfassend dargestellt. Es ist zu sehen, dass die bHLH-Domäne und damit die APSES-Domäne eine entscheidende Funktion einnimmt, da sie bei fast allen untersuchten Prozessen eine essentielle Rolle spielt. Interessanterweise wurde parallel dazu beobachtet, dass ein Fehlen von nur 13 AS der C-terminalen APSES-Domäne (D5) zu einem Verlust der Funktionalität des Efg1p-Proteins führt. Andere Regionen im Efg1p haben ebenfalls eine wichtige Funktion. So wurde gezeigt, dass für die Chlamydosporen-Bildung beide Glutamin-reichen Domänen und beim spontanen Phänotypwechsel von *opaque*- zu *white*-Zellen die C-terminale Glutamin-reiche Domäne essentiell ist und in ihrer Gesamtheit benötigt wird. Aber auch die N-terminale Glutamin-reiche Domäne hat eine Funktion beim spontanen Phänotypwechsel. So wurde beobachtet, dass bei einer Überproduktion des Efg1p-Proteins in den Deletionsstämmen D1 und D2 der Wechsel von *opaque*- zu *white*-Zellen einen leichten Defekt aufweist. Damit scheint diese Region eine aktivierende Funktion für diesen Phänotypwechsel zu haben. Die C-terminale Glutamin-reiche Domäne hat neben der essentiellen Funktion für die Chlamydosporen-Bildung und für den spontanen Phänotypwechsel, eine aktivierende Funktion bei der Induktion von Hyphen auf festem Lee's-Medium. Ein besonderes Augenmerk gilt den Deletionen D10 und D11. Diese Region, mit der Alanin- und Prolin-reichen Domäne scheint keine essentielle Funktion zu haben, da bei einem Verlust dieser Region, die Aktivität des Efg1p-Proteins, unter den untersuchten Bedingungen, nicht verloren geht. Auch eine Insertion eines HA-Epitops von einer Länge von neun AS in diese Region führt zu keiner Veränderung der Efg1p-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde aufgeklärt, dass bei einem Verlust der N-terminalen Glutamin-reichen Domäne und des C-terminalen Bereichs der APSES-Domäne ein starker Defekt der Repressor-Aktivität zu verzeichnen ist. Bei den Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikationen wurde gezeigt, dass bei einem Verlust der bHLH-Domäne sowohl die Phosphorylierungen, als auch die unbekannt Modifikationen zum größten Teil verloren gehen. In den weiteren Abschnitten werden mögliche Funktionsweisen dieser Domänen und mögliche Modifikationen am Efg1-Protein diskutiert.

## 4.2 Die APSES-Domäne – eine wichtige Sequenz für die DNA-Bindung

Der Transkriptionsfaktor Efg1p gehört zu einer kleinen Gruppe von Proteinen, die morphologische Prozesse in Ascomyzeten regulieren. Diese steuern die Konidiosporenbildung wie AnStuAp bei *Aspergillus nidulans* und PmStuAp bei *Penicillium marneffe*, sowie die Ascosporenenreife NcAsm1p von *Neurospora crassa* (Miller, K.Y. *et al.*, 1992; Aramayo *et al.*, 1996; Borneman *et al.*, 2002). Bei *S. cerevisiae* wird die Pseudohyphenbildung von Phd1p und Sok2p reguliert. Eine Überproduktion von Phd1p und die Deletion von Sok2p fördern die Bildung von Pseudohyphen (Gimeno und Fink, 1994; Ward *et al.*, 1995).

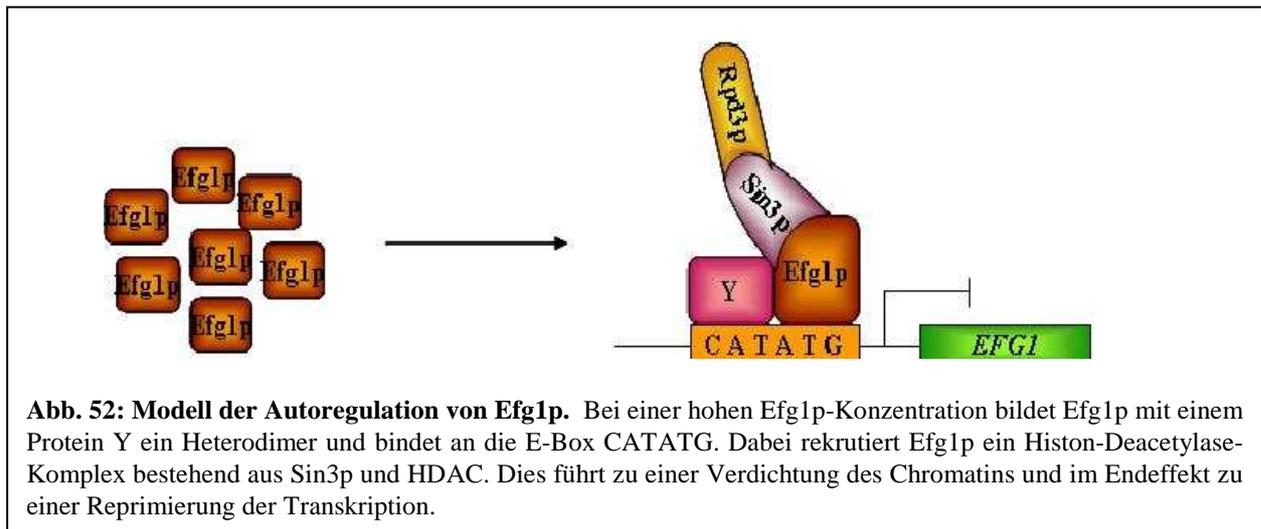
Bei *C. albicans* konnten ebenfalls zwei Transkriptionsfaktoren dieser Proteinfamilie identifiziert werden. Während Efg1p sowohl morphologische Prozesse, als auch die Expression von Metabolismus und Virulenz-relevanter Faktoren reguliert und daher ein globaler Regulator in *C. albicans* ist (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Kumamoto und Vincs, 2005), ist die Funktionsweise von Efh1p noch größtenteils ungeklärt (Doedt *et al.*, 2004). Setiadi (2006) konnte aber zeigen, dass Efh1p synergistisch mit Efg1p bei der Repression der Hyphenbildung unter Hypoxie wirkt. Die Gemeinsamkeit dieser Transkriptionsfaktoren liegt strukturell in der so genannten APSES-Domäne. Diese 100 Aminosäuren umfassende Domäne beinhaltet zentral ein bHLH-Motiv und ist in den sieben bekannten Mitgliedern der APSES-Familie hoch konserviert (Stoldt *et al.*, 1997). Der Helix-Loop-Helix (HLH)-Teil der Domäne dient wahrscheinlich zur Dimerisierung mit anderen Interaktionspartnern, wodurch die beiden basischen Regionen des Motivs zusammengeführt werden und eine DNA-Bindung ermöglicht wird. Hierbei bindet jede basische Region die Hälfte eines Bindemotivs (Davis, R.L. *et al.*, 1990; Voronova und Baltimore, 1990). Damit jedoch ein Transkriptionsfaktor zwischen der zu transkribierenden DNA und der basalen Transkriptionsmaschinerie vermitteln kann, benötigen Transkriptionsfaktoren zusätzlich eine so genannte Transaktivierungsdomäne (Mitchell und Tjian, 1989). Diese Domäne tritt mit dem basalen Transkriptionskomplex entweder über eine direkte Bindung oder über zwischengeschaltete Proteine in Kontakt (Berger *et al.*, 1990; Pugh und Tjian, 1990; Lin *et al.*, 1991). Eine solche Funktion könnten die APSES-Bereiche besitzen, die die bHLH-Domäne flankieren. Dagegen spricht jedoch ein Ein-Hybrid-Experiment, bei dem die Bindung der Efg1p-Deletionsvarianten an das MCB-Element untersucht wurde. In diesem



Versuch konnte gezeigt werden, dass die Deletionsvarianten D4, D5, D8 und D9 keine Bindung an das MCB-Element aufweisen (Lengeler, persönliche Mitteilung). Die Deletionen D4, D8 und D9 liegen alle in der APSES-Domäne, während die Deletion D5 C-terminal von der APSES-Domäne lokalisiert ist und 13 Aminosäuren von der APSES-Domäne beinhaltet. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass die flankierenden APSES-Bereiche für die DNA-Bindung benötigt werden. Auf Grund der Tatsache, dass die C-terminale Glutamin-reiche Domäne (Q-Domäne) für eine Hypheninduktion auf festen Lee's-Platten benötigt wird, kann angenommen werden, dass möglicherweise die Glutamin-reichen Regionen, die keinen Defekt des Dimorphismus zeigen, trotzdem eine Funktion haben, da in keiner Deletion die gesamte Q-Domäne fehlt. Möglicherweise reicht ein Teil dieser Region aus, um als Transaktivierungsdomäne zu fungieren. Eine mögliche Regulation der Hypheninduktion von Efg1p über die APSES-Domäne und der Glutamin-reichen Regionen könnte folgendermaßen ablaufen (Abb. 51). Durch äußere Signale wird der PKA-Signaltransduktionsweg initiiert, wodurch Efg1p durch die Proteinkinase A phosphoryliert und aktiviert wird. Dieses aktivierte Efg1-Protein bildet mit einem anderen bHLH-Protein ein Heterodimer und bindet an eine Zielsequenz, wie z. B. eine E-Box. Bislang sind keine genauen Zielsequenzen von Efg1p bekannt; da jedoch eine Homologie zu den bHLH Transkriptionsfaktoren besteht, die E-Boxsequenzen erkennen, wird angenommen, dass Efg1p an diese Konsensus-Sequenz binden könnte. Tatsächlich wurde *in vitro* gezeigt, dass Efg1p an eine E-Boxsequenz 5'-CATTG-3' im *ALS1*-Promotorbereich binden kann (Leng *et al.*, 2001). Auch eine Footprint-Analyse konnte zeigen, dass Efg1p an die E-Box 5'-CATATG-3' *in vitro* bindet (Bußmann, 2006).

Durch diese Bindung von Konsensus-Sequenzen über ein Efg1p-ProteinX-Heterodimer werden unterschiedliche Gene, die hyphenrelevant sind, aktiviert bzw. die Expression von Genen, die die Hypheninduktion inhibieren, reprimiert. Die Aktivierung von Genen könnte hierbei über eine direkte Interaktion von Efg1p mit den Q-Domänen (Transaktivierungsdomäne) mit der Polymerase stattfinden. Möglich wäre aber auch eine Interaktion zwischen dem Swi/Snf-Komplex, der durch Efg1p an die Promotoren von Zielgenen rekrutiert wird. Der Swi/Snf-Komplex ist ein ATP-abhängiger Chromatin-Remodellierungskomplex, der auf die Transkription aktivierend und reprimierend wirken kann (Martens und Winston, 2003). Dieser kann an die DNA und an Nukleosomen mit hoher Affinität binden, zeigen aber keine Sequenzspezifität (Hassan *et al.*, 2002), so dass dieser Proteinkomplex wahrscheinlich von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Regionen rekrutiert wird (Neely *et al.*, 2002). Stämme mit Mutationen in den Genen *SWI1* und *SNF1* zeigen in *C. albicans* ähnliche Phänotypen wie *efg1*-Mutanten und sind ebenfalls avirulent (Mao *et al.*, 2006). Da dieser Komplex ebenfalls essentiell für die Hyphenbildung in *C. albicans* ist und eine allgemeine Funktion aufweist, wäre es möglich, dass Efg1p mit diesem globalen Regulator ebenfalls interagiert. Ein weiterer wichtiger Punkt ist hierbei die Swi/Snf-Rekrutierung durch die Proteine Ste12/Tec1, die die Bindung von Flo8p an den *STAI*-Promotor verstärken (Kim *et al.*, 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass Flo8p und Efg1p interagieren (Cao *et al.*, 2006). So wäre es möglich, dass bei einer Aktivierung bzw. Reprimierung von Genen Efg1p diesen Komplex rekrutiert und mit Flo8p interagiert. Bei einer Induktion von Genen reicht jedoch eine Interaktion mit dem Swi/Snf-Komplex nicht aus. Es müsste darüber hinaus noch eine Histon-Acetyl-Transferase rekrutiert werden, die den Acetylierungsstatus der Histone moduliert. Eine ähnliche Regulation von Genen wurde auch bei den Transkriptionsfaktoren Myc und MyoD nachgewiesen. So sind  $\frac{1}{3}$  aller Gene, die durch MyoD reguliert werden, vom Swi/Snf-Enzymkomplex abhängig. Auch die Bindung von MyoD an die DNA wird durch diesen Komplex verstärkt. (de la Serna *et al.*, 2005). Aber auch die Regulation von Prozessen in Säugerzellen ist von einer direkten Beziehung zwischen Myc und Swi/Snf abhängig (Nagl *et al.*, 2006).

Während der Hypheninduktion wird die Efg1-Proteinkonzentration bzw. -Aktivität erhöht, wodurch die Hyphenbildung unterdrückt werden würde (Tebarth *et al.*, 2003) und daher reprimiert Efg1p über negative Autoregulation sein eigenes Transkript. Dabei rekrutiert Efg1p das Protein Sin3p zum eigenen Promotor (Doedt *et al.*, 2004). Möglicherweise bildet Efg1p mit einem Protein Y über die HLH-Domäne ein Heterodimer und bindet an eine E-Boxsequenz im eigenen Promotorbereich (Abb. 52). Im *EFG1*-Promotor existieren zwei E-Boxen mit der



Sequenz 5'-CAAGTG-3' und 5'-CATATG-3'. In einer Footprint-Analyse konnte *in vitro* eine Bindung zwischen Efg1p und der E-Box mit der Konsensussequenz 5'-CATATG-3' im Promotor nachgewiesen (Bußmann, 2006) und in dieser Arbeit durch ein *in vitro*-Verzögerungsgel bestätigt werden, wenngleich nur eine schwache *in vitro*-Bindung gezeigt werden konnte. Diese Tatsachen bekräftigen die Vermutung, dass die negative Autoregulation über die Bindung der E-Box 5'-CATATG-3' verlaufen könnte. Der Proteinkomplex, der aus der Histondeacetylase Rpd3p und dem Sin3-Protein besteht, wird zur Gruppe der Klasse I-Histondeacetylasen gezählt. Dieser Proteinkomplex ist an der Repression vieler Gene beteiligt (Bernstein *et al.*, 2000; Kurdistani *et al.*, 2002) und wird durch DNA-bindende Protein, wie Ume6p rekrutiert (Kadosh und Struhl, 1997). Die Rekrutierung durch Efg1p könnte möglicherweise über die flankierenden APSES-Bereiche oder durch die Q-Domänen erfolgen. Die Deacetylierung der Histone durch den Protein-Komplex Sin3p/Rpd3p führt zu einer Verdichtung des Chromatins, so dass unter anderem die Bindung von TATA-Binding Protein (TBP) an die TATA-Box verhindert wird (Shimizu *et al.*, 2003) und die Transkription reprimiert wird.

Die Dimerisierung von bHLH-Proteinen erfolgt bei Efg1p unter anderem über das Helix-Loop-Helix-Motiv an Transkriptionsfaktoren gleicher Bindedomäne. So wurden viele Dimerisierungspartner des Myc-Proteins identifiziert, die alle ein bHLH Bindemotiv enthalten (Luscher, 2001). Das bHLH-Protein MyoD interagiert z. B. mit dem Transkriptionsfaktor E47, welches ebenfalls eine bHLH-Domäne besitzt (Wendt *et al.*, 1998). Auch die bHLH-Proteine Pho4p, Ino2p, Cbf1p in Hefe bilden mit anderen bHLH-Proteinen ein Dimer (Robinson und Lopes, 2000). Im Falle von Efg1p sind drei Interaktionspartner bekannt, die jedoch keine bHLH-Domäne besitzen. Sin3p gehört wie schon im vorangegangenen Abschnitt erläutert, zu einem Histondeacetylase-Komplex und fungiert als Cofaktor der Transkription. Die beiden anderen Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Morphogenese von *C. albicans* spielen. So ist Czf1p ein Transkriptionsfaktor, der bei Einbettung in eine Agar-Matrix, eine hypheninduzierende Wirkung auf *C. albicans* ausübt (Brown *et al.*, 1999). Dieses

Protein besitzt im zentralen Bereich eine Glutamin-reiche-Region und am C-terminalen Ende eine cysteinreiche-Domäne, die Ähnlichkeit zu bekannten Zinkfinger-Proteinen zeigt (Whiteway *et al.*, 1992). Czf1p könnte über die Glutamin-reiche-Domäne mit den flankierenden APSES-Bereichen oder mit den Glutamin-reichen-Domänen des Efg1p-Proteins interagieren. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Interaktion über das Zinkfinger-Motiv. In *Drosophila* konnte kürzlich ein Zusammenwirken eines Zinkfinger-Proteins und eines bHLH-Proteins über ihre jeweiligen Bindemotive nachgewiesen werden (Acar *et al.*, 2006). So scheint eine Interaktion über die beiden Bindemotive von Efg1p und Czf1p nicht unmöglich zu sein. Der dritte bekannte Interaktionspartner von Efg1p ist das Flo8-Protein. Dieser Transkriptionsfaktor, der ebenfalls den Dimorphismus in *C. albicans* reguliert, besitzt eine N-terminale LUFS-Domäne und eine C-terminale Region, die für die Transkriptionsaktivität notwendig ist (Cao *et al.*, 2006). Beide Regionen könnten mit den bHLH-flankierenden APSES-Bereichen oder mit den Q-Domänen von Efg1p interagieren.

Ein weitaus wahrscheinlicherer Interaktionspartner könnte das homologe APSES-Protein Efh1p sein. So könnten beide bHLH-Domänen miteinander interagieren und Gene aktivieren bzw. reprimieren. Bis jetzt konnte weder eine physische Interaktion zwischen den beiden APSES-Proteinen, noch eine Homodimer-Bildung von Efg1p nachgewiesen werden (Doedt, 2004). Durch Zwei-Hybrid-Versuche konnte dagegen die Homodimerbildung von Efh1p nachgewiesen werden (Bockmühl, 2001; Doedt *et al.*, 2004).

### 4.3 Funktion der Glutamin-reichen-Domänen

Die Phänotypen der deletierten Efg1p-Varianten haben gezeigt, dass die APSES-Domäne für die Hefe-, Hyphen- und Pseudohyphenform wichtig ist. Für die Chlamydosporenbildung und für den spontanen Phänotypwechsel zwischen *white*- und *opaque*-Zellen sind jedoch neben der APSES-Domäne die Glutamin-reichen-Domänen (Q-Domäne) essentiell und werden in ihrer Gesamtheit benötigt. Für die Chlamydosporenbildung werden beide N- und C-terminalen Q-Domänen (3.1.4) und für den *white/opaque*-Phänotypwechsel nur die N-terminale Q-Domäne (3.1.8) benötigt.

Transaktivierungsdomänen haben eine wichtige Funktion als Vermittler zwischen Transkriptionsfaktor und der basalen Transkriptionsmaschinerie (Mitchell und Tjian, 1989). Diese Domänen haben gewöhnlich eine Größe von 30 bis 100 Aminosäuren, die strukturell sehr flexibel sind und nicht eindeutig klassifiziert werden können. Ein häufiges Charakteristikum dieser Domänen ist jedoch das gehäufte Auftreten von Aminosäureresten mit gleicher chemischer Eigenschaft, so dass sie häufig nach diesen Aminosäuren eingeteilt werden. Häufig genannte Domänen hierbei sind Regionen mit vielen sauren Aminosäuren, Prolin-reiche und Glutamin-reiche Domänen (Giniger *et al.*, 1985; Mitchell und Tjian, 1989; Meshi und Iwabuchi, 1995). Prolin- und Glutamin-reiche Domänen interagieren hierbei mit TBP (TATA-Binding Protein), TAFs (TBP-assoziierte Faktoren) und anderen Kofaktoren des basalen Transkriptionskomplexes (Meshi und Iwabuchi, 1995). So konnte gezeigt werden, dass die Q-Domäne im Reis-Transkriptionsfaktor RF2a direkt mit dem TBP interagiert (Dai *et al.*, 2003). Auch die Q-Domäne im Sp3-Protein konnte als stark aktivierende Region mit einer Interaktion zu TAF entdeckt werden (Dennig *et al.*, 1996). Solche oder ähnliche Funktionsweisen könnten ebenfalls als Funktion der Q-Domänen in Efg1p zugrunde liegen. Hierbei scheint allerdings für den *white/opaque*-Phänotypwechsel nur die C-terminal gelegene Q-Domäne von Interesse zu sein, da die Deletion der N-terminale Q-Domäne weiterhin die Bildung von White-Zellen erlaubt. Diese Region scheint eher eine verstärkende Funktion einzunehmen. Für die Chlamydosporenbildung hingegen sind dagegen beide Q-Domänen essentiell. Das Protein Oct-2

in Säugerzellen besitzt ebenfalls zwei Transaktivierungsdomänen (Q- und Prolin-reiche-Domäne), die am N- und C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert sind. Diese Domänen können miteinander interagieren oder bilden untereinander Dimere, um die Transkription zu aktivieren (Tanaka *et al.*, 1994). Auf Grund der ähnlichen Verteilung der beiden Q-Domänen im Efg1p könnte eine ähnliche Funktionsweise für die Chlamydosporen-Induktion vermutet werden.

Auf Grund der Anhäufung von Aminosäuren mit gleichen chemischen Eigenschaften in der Q-Domäne wird angenommen, dass diese eine definierte Sekundärstruktur ausbilden, die in einem „induced fit“-Mechanismus mit dem Interaktionspartner in Kontrakt treten. Dieser Mechanismus wurde bei den Proteindomänen des Herpes simplex Virus-VP16-Proteins und des CREB-Transkriptionsfaktors beobachtet (Uesugi *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1998). Auch konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Helix-Struktur in der Q-Domäne des „Aryl Hydrocarbon Rezeptors“ essentiell für die Interaktion zwischen der Domäne und dem TATA-Bindungsprotein ist (Watt *et al.*, 2005). Möglicherweise könnte die Region zwischen der N-terminalen Q-Domäne und der APSES-Domäne von Efg1p eine „Spacer“-Funktion einnehmen, um eine optimale Bindung zwischen Q-Domäne und den interagierenden Proteinen zu ermöglichen.

#### 4.4 Efg1p bindet an die E-Box 5'-CATATG-3' im eigenen Promotor

Erste Hinweise für eine negative Autoregulation von Efg1p lieferte eine Northern-Analyse, in der sich zeigte, dass der Transkriptspiegel vom *EFG1* während der Hyphenbildung abnimmt. Wird die negative Autoregulation verhindert, so findet keine Hypheninduktion statt (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Des Weiteren konnten durch Reporterstudien gezeigt werden, dass die Regulation des *EFG1*-Transkripts auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Tebarth, 2001). So lag die Vermutung Nahe, dass Efg1p, ähnlich wie cMyc, sein eigenes Transkript durch Autoregulation reguliert. Durch Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass Efg1p an seinen eigenen Promotor bindet (Doedt, 2004). Ein EMSA-Experiment mit einem 313 bp-Promotorfragment stromaufwärts von der TATA-Box des *EFG1*-Gens zeigte keine Bindung von Efg1p (Doedt, 2000). Ein weiteres Fragment mit einer Länge von 408 bp weiter stromaufwärts bestätigte dagegen die Bindung von Efg1p (Bußmann, 2006). Interessanterweise liegen in dieser Sequenz zwei E-Boxen, die möglicherweise von Efg1p gebunden werden.

E-Boxen sind häufige Sequenzen in Promotorbereichen, die durch bHLH-Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Auf Grund der Homologie in der bHLH-Domäne zu den Transkriptionsfaktoren cMyc und MyoD (Ferre-D'Amare *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1994), die E-Boxsequenzen 5'-CACGTG-3' und 5'-CAGCTG-3' binden, kann angenommen werden, dass Efg1p ebenfalls diese Erkennungssequenzen bindet. Durch *in vitro*-Bindeexperiment wurde gezeigt, dass Efg1p an ein künstliches Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-CATTTG-3', welches sich im *ALS8* Promotorbereich befindet und von Efg1p reguliert wird, bindet (Leng *et al.*, 2001). Durch Ein-Hybrid-Experimenten konnte allerdings eine Bindung von Efg1p an unterschiedliche E-Boxsequenzen und auch die 5'-CATTTG-3'-Sequenz nicht bestätigt werden (Hilbig, 2004). Eine Footprint-Analyse mit dem 408 bp Fragment zeigte, dass von den beiden E-Boxen 5'-CAGATG-3' und 5'-CATATG-3' im Promotorbereich, die weiter von der TATA-Box entfernte Sequenz 5'-CATATG-3' von Efg1p gebunden wird (Bußmann, 2006). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit durch ein Verzögerungsgel mit Epitop markiertem GST-Efg1p und einem künstlichen Oligonukleotid, welches die E-Box 5'-CATATG-3' und die flankierenden Promotorbereiche beinhaltet, bestätigt werden (3.3). Durch unterschiedlich lange Oligonukleotide konnte außerdem gezeigt werden, dass die flankierenden Bereiche der E-Box

für die Bindung von Efg1p, eine unterstützende Auswirkung haben und die Bindung verstärken. Auch konnte gezeigt werden, dass bei einer Zugabe von 100fachem Überschuss an dreifachem MCB-Element die Komplexbildung von E-Box zu Efg1p reduziert wird. Ob die negative Autoregulation von Efg1p über die Bindung der E-Box 5'-CATATG-3' reguliert wird, ist immer noch fraglich und müsste durch Deletion dieser E-Box im *EFG1*-Promotorbereich untersucht werden.

#### 4.5 Efg1p wirkt als Repressor

Der Transkriptionsfaktor Efg1p ist sowohl für morphogenetische und metabolische Prozesse, als auch für die Induktion von Virulenzfaktoren essentiell (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999a; Srikantha *et al.*, 2000; Kumamoto und Vines, 2005). In diesem Zusammenhang fungiert Efg1p letztendlich als Aktivator. Unter mikroaeroben und hypoxischen Bedingungen fungiert Efg1p jedoch als Repressor und unterdrückt die Hyphenbildung. (Sonneborn *et al.*, 1999a; Setiadi, E.R. *et al.*, 2006). Des Weiteren reprimiert Efg1p nach der Hypheninduktion sein eigenes Transkript über eine negative Autoregulation. Durch eine Chromatin-Immunpräzipitations-(ChIP)Analyse konnte eine direkte Bindung von Efg1p mit dem *EFG1*-Promotor nachgewiesen werden. (Tebarth *et al.*, 2003). Diese Fakten sprechen für eine bivalente Funktionsweise von Efg1p. In einer Ein-Hybrid-Analyse in *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass Efg1p als Repressor der Gen-Regulation in diesem System fungiert (Tebarth *et al.*, 2003). Dieses System besteht aus einem LexA-Efg1p Fusionsprotein, das über den LexA-Operator an den Promotor binden kann. Die Aktivität von Efg1p wird über das lacZ-Reportergen bestimmt. Diese Methode wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Repressor-Aktivität in verschiedenen Kinase-Mutanten und in *efg1*- und *efh1*-Mutanten zu untersuchen (3.2). Das Ergebnis zeigt ausschließlich in der *efg1*-Mutante eine aufgehobene Repressor-Aktivität des Efg1-Proteins. Nur in der *efg1*-Mutante ist ausschließlich das LexA-Efg1 Fusionsprotein vorhanden, in der keine Repression stattfindet. Möglicherweise fungiert ein Efg1p-Homodimer als Repressor in *C. albicans*, der wenigstens ein unverändertes Efg1-Protein für die reprimierende Funktion benötigt. Wahrscheinlich ist durch die Fusion von Efg1p an LexA eine sterische Hinderung der Funktion aufgetreten, oder es hat eine Konformationsänderung stattgefunden, wodurch eine Homodimer-Bildung zwischen zwei LexA-Efg1-Fusionsproteinen nicht möglich ist.

Eine Reprimierung von Genen kann durch unterschiedliche Mechanismen bewirkt werden. Ein bekannter Mechanismus ist z.B. eine konkurrierende Bindung von Aktivatoren und Repressoren um eine Bindungsstelle auf der DNA. Ein Beispiel hierfür ist der gut untersuchte Transkriptionsfaktor Max. Ein Max-Homodimer oder ein Max/Mad-Heterodimer blockieren die DNA-Bindungsstelle des Myc/Max-Heterodimers. Da nur der Myc-Transkriptionsfaktor eine Transaktivierungsdomäne besitzt, wird durch die Bindung von Max/Max oder Max/Mad die Transkription reprimiert (Ayer und Eisenman, 1993). Aber auch eine Maskierung von Aktivierungsdomänen bzw. DNA-Bindedomänen durch eine Heterodimerbildung mit einem Aktivator führt zu einer Reprimierung der Transkription (Neuhold und Wold, 1993). Als Beispiel kann hier das HLH-Protein Id (Inhibitor der Differenzierung) aus Säugerzellen genannt werden, das mit MyoD dimerisiert. Durch das Fehlen einer DNA-Bindedomäne am Id-Protein kann der Dimer nicht an die DNA binden und reprimiert so die Zielgene. Dagegen führt eine Bindung des Gal80-Proteins an einen Teil der Aktivierungsdomäne von Gal4p zu einer Verhinderung der Transaktivierung (Jayaraman *et al.*, 1994). Ein anderer Mechanismus der Reprimierung ist die Rekrutierung von Korepressoren, wie bereits am Beispiel von Sin3p/Rpd3p

diskutiert, oder aber auch eine direkte Interaktion mit dem basalen Transkriptionskomplex. Solche möglichen reprimierenden Mechanismen könnten ebenfalls bei der Regulation durch Efg1p denkbar sein.

Mit Hilfe der LexA-Efg1p-Deletionsvarianten wurde in einem Ein-Hybrid-Experiment beobachtet, dass beim Fehlen der C-terminalen Region der N-terminalen Q-Domäne (D2) und beim Verlust des C-terminalen Endes der APSES-Domäne (D9) die reprimierende Funktion von Efg1p verloren geht. Möglicherweise haben die Deletionen D2 und D9 zu einer Konformationsänderung von Efg1p geführt, wodurch eine Homodimerbildung von Efg1p nicht mehr möglich ist oder eine Interaktion mit Korepressoren und Interaktionspartnern verhindert ist. Der Verlust dieser reprimierenden Funktion von Efg1p scheint jedoch keinen Einfluss auf die Hyphenbildung zu haben, da die Stämme mit LexA-Efg1p-Deletionsvarianten und auch die *efg1*-Mutanten mit dem LexA-Efg1-Fusionsproteinen weiterhin Hyphen bilden können. Möglicherweise fungiert Efg1p nicht als Repressor bei der Hyphenbildung, sondern bei anderen molekularen Prozessen. Auf Grund der Tatsache, dass für die Hypheninduktion der Transkriptionsfaktor Efg1p benötigt wird, spricht eher für eine aktivierende Rolle bei der Hyphenbildung.

## 4.6 Efg1p ist posttranslational modifiziert

Das Proteom übersteigt bei weitem die Anzahl an Proteinen, die sich aus der kodierenden DNA ableiten. Ursachen für diese Diversität ist eine gerichtete posttranslationale Modifikation (PTM). Diese PTMs sind kovalente Modifikationen, die an der Primärstruktur des Proteins vorgenommen werden. Darunter fallen z.B. die reversiblen Modifikationen Phosphorylierung, Acylierung, Glykosylierung und Ubiquitinierung (Mann und Jensen, 2003; Seo und Lee, 2004). Dies ist nur ein kleiner Teil der bekannten PTMs. Im Laufe der Zeit wurden 300 verschiedenen PTMs gefunden, wobei in regelmäßigen Abständen weitere neue gefunden werden (Jensen, 2004).

Ein Protein kann mehrere Modifikationen reversibel erhalten (Kwon *et al.*, 2006). Durch diese hohe Variabilität und Dynamik der PTMs wird eine Analyse von Proteinen erschwert, so dass häufig die genaue Funktion und die Art der Modifikation ungeklärt bleiben. Dies ist ein Grund, warum eine Datenbankanalyse erschwert ist. Außerdem sind Konsensussequenzen (ausgenommen ist die Phosphorylierung) für viele Modifikationen unbekannt.

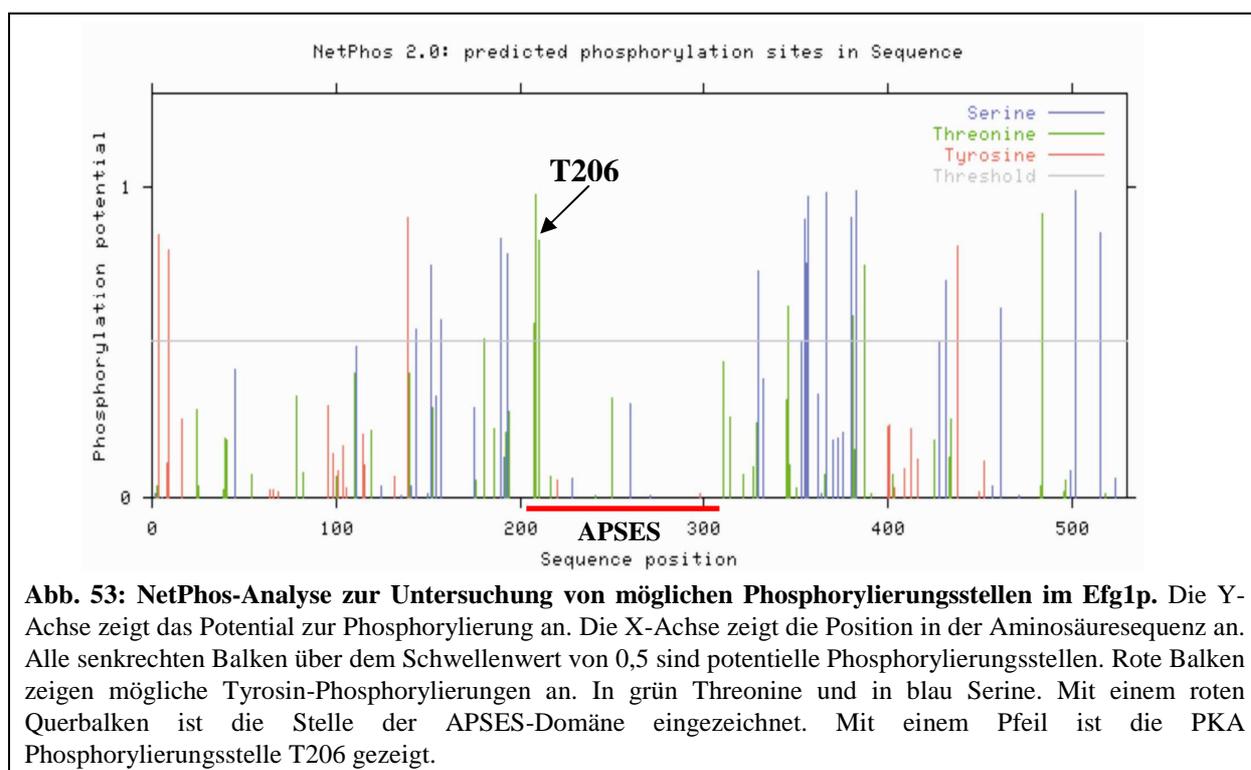
### 4.6.1 Phosphorylierung

Auf Grund seines Laufverhaltens in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde bereits angenommen, dass der Transkriptionsfaktor Efg1p posttranslational modifiziert wird (Sonneborn, 1999; Doedt, 2004). Das HA-Efg1-Fusionsprotein aus *C. albicans* zeigte in einem Immunoblot eine Dreifach-Bande und wies eine molekulare Masse von 90 kDa auf, anstelle der errechneten Masse von 61 kDa. Bockmühl (2001) konnte durch eine Dephosphorylierung von Efg1p mit alkalischer Phosphatase nachweisen, dass die beiden oberen Banden auf Phosphorylierungen zurückzuführen sind. Durch gezielte Aminosäuren-Austausche an der Stelle T206 konnte nachgewiesen werden, dass Efg1p an diesem Threonin durch die Proteinkinase A phosphoryliert wird (Bockmühl und Ernst, 2001). Mit demselben Versuch konnte eine potentielle Phosphorylierungsstelle durch die Caseinkinase II ausgeschlossen werden (Bockmühl, 2001). Durch diese Versuche konnte jedoch nicht aufgeklärt werden, wie viele Phosphorylierungsstellen

an welchen Positionen von Efg1p vorkommen. In dieser Arbeit wurde durch Expression der Efg1p-Deletionsvarianten und anschließender Behandlung mit alkalischer Phosphatase untersucht, in welchen Regionen Efg1p phosphoryliert ist. Das Ergebnis zeigt, dass höchstwahrscheinlich die bHLH-Domäne in der APSES-Domäne stark phosphoryliert ist. Möglich wäre aber auch die Vermutung, dass durch das Fehlen der APSES-Domäne, die Proteinfaltung verändert ist, so dass Efg1p nicht phosphoryliert werden kann.

Mit Hilfe einer Datenbank-Analyse mit dem Programm NetPhos konnten mögliche Phosphorylierungsstellen in Efg1p ermittelt werden. Dieses Programm sucht anhand von Konsensus-Sequenzen nach möglichen Phosphorylierungsstellen bekannter Kinasen (Abb. 53). Interessanterweise ist in der APSES-Domäne kaum eine Phosphorylierungsstelle durch einen Vergleich mit anderen Proteinen vorhersagbar. Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung, dass durch das Fehlen der APSES-Domäne die Konformation von Efg1p so verändert wird, dass Efg1p nicht phosphoryliert werden kann. Aber auf Grund der Tatsache, dass die Datenbank-Analyse nur potentielle Phosphorylierungsstellen aufzeigt, sind Phosphorylierungen in der APSES-Domäne bzw. in der bHLH-Domäne nicht grundsätzlich ausgeschlossen.

Phosphorylierungen haben für die Regulation von Proteinen eine bedeutende Funktion. So



**Abb. 53: NetPhos-Analyse zur Untersuchung von möglichen Phosphorylierungsstellen im Efg1p.** Die Y-Achse zeigt das Potential zur Phosphorylierung an. Die X-Achse zeigt die Position in der Aminosäuresequenz an. Alle senkrechten Balken über dem Schwellenwert von 0,5 sind potentielle Phosphorylierungsstellen. Rote Balken zeigen mögliche Tyrosin-Phosphorylierungen an. In grün Threonine und in blau Serine. Mit einem roten Querbalken ist die Stelle der APSES-Domäne eingezeichnet. Mit einem Pfeil ist die PKA Phosphorylierungsstelle T206 gezeigt.

konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Max durch die Caseinkinase II zu einer stärkeren DNA-Bindung des Homodimers führt. Es wird vermutet, dass das Max/Max Homodimer durch diese Phosphorylierung Gene reguliert, die durch das Myc-Max Heterodimer aktiviert werden (Bergstrom und Tapscott, 2001). Der Transkriptionsfaktor c-Myc kann andererseits aber durch die Serin/Threonin Proteinkinase Pak2, die unter zellulärem Stress aktiviert wird, an den Aminosäuren Thr-358, Ser-373 und Thr-400 phosphoryliert werden, wodurch der Myc-Max Heterodimer nicht an die DNA binden kann. Mit diesem Mechanismus wird die zelluläre Proliferation und die Apoptose verhindert (Huang *et al.*, 2004). Weiterhin wurde berichtet, dass der Transkriptionsfaktor MyoD durch die Proteinkinase C phosphoryliert wird und dadurch nicht an die DNA binden kann (Johnson *et al.*, 1996). Solche oder ähnliche Regulationsmechanismen durch eine Phosphorylierung könnten ebenfalls an Efg1p erfolgen. Ob tatsächlich die bHLH-Domäne phosphoryliert wird, oder ob bei Deletion dieser Domäne eine

Konformationsänderung stattfindet, die eine Phosphorylierung an Efg1p nicht erlaubt, ist noch unklar. Alternativ könnten punktuelle Phosphorylierungen über das gesamte Efg1-Protein verteilt sein, wie es beim Transkriptionsfaktor c-Myc der Fall ist.

#### 4.6.2 Efg1p hat das elektrophoretische Laufverhalten eines 90 kDa-Proteins

Mit Hilfe von Dephosphorylierungsversuchen konnte aufgeklärt werden, dass die größeren beiden Efg1p-Banden in einer SDS-PAGE auf Phosphorylierungen beruhen (Bockmühl, 2001). Der Größenunterschied in einem Immunoblot von 30 kDa zwischen theoretischer Masse (61 kDa) und detektierter Größe (ca. 90 kDa) konnte jedoch nicht geklärt werden. Mit Hilfe der Deletionsvarianten wurde nachgewiesen, dass Efg1p überwiegend in der APSES-Domäne und dort größtenteils vermutlich in der bHLH-Domäne modifiziert ist. Diese Tatsache schließt jedoch nicht aus, dass durch das Fehlen der APSES-Domäne (D4) eine Fehlfaltung des Efg1-Proteins erfolgt ist, die zu einem Verlust der Modifikationen geführt haben könnte. Der Efg1p Transkriptionsfaktor scheint an mehreren Stellen modifiziert zu sein, da in einem Immunoblot alle Deletionen einen Größenunterschied zur theoretischen Masse zeigen.

Unter den vielen PTMs, die im Laufe der Zeit gefunden werden konnten, konnten an 15 der 20 Aminosäuren eine Modifikation an den Seitenketten detektiert werden. (Walsh C.T., 2005). Eine von vielen Modifikationen, die speziell an Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden konnten, ist die Acetylierung. Acetylierungen werden am N-terminalen Ende bei Histonen an den Lysine-Seitenketten der Histone beobachtet. Dadurch werden positive Ladungen abgeschirmt und die Affinität zur negativ-geladenen DNA wird reduziert. Dies führt zu einer Auflockerung des Chromatins und die Transkription wird aktiviert. Bei Transkriptionsfaktoren können Acetylierungen andere und viel komplexere Mechanismen auslösen. So wird bei c-Myc durch Acetylierungen am Leucin-Zipper-Motiv und am Kernlokalisierungssignal das Protein stabilisiert, so dass seine Halbwertszeit von 41 min auf 135 min gesteigert wird (Patel *et al.*, 2004). Eine Acetylierung in der Transaktivierungsdomäne durch p300 führt zu einer erhöhten Aktivität von c-Myc (Faiola *et al.*, 2005). Aber auch am Transkriptionsfaktor MyoD wurden Acetylierungen nachgewiesen. MyoD rekrutiert für die Aktivierung der Transkription die Histone-Acetyltransferase (HAT) p300. Diese wiederum rekrutiert eine andere HAT, das CBP-Protein. Das p300-Protein ist für die Acetylierung von Histonen zuständig, während CBP/p300 zusammen die Aufgabe haben, den Transkriptionsfaktor MyoD in der Nähe der DNA-Bindungsdomäne zu acetylieren. Beide Funktionen sind nötig, um eine optimale Transkriptionsaktivität hervorzurufen (Tapscott, 2005). Auf Grund der Überlegungen, dass Efg1p möglicherweise ebenfalls HATs rekrutiert, könnten ebenfalls Acetylierungen im Efg1p vorkommen, um dessen Aktivität zu stabilisieren bzw. zu verstärken. Diese Vermutungen müssten jedoch durch direkte Versuche, wie z. B. durch eine massenspektroskopische Analyse, gezeigt werden. Die bisher genannten PTMs tragen aber alle nur wenig zur molekularen Masse bei, die das veränderte Laufverhalten von Efg1p nicht in dem Maße beeinflussen können, wie es im SDS-PAGE zu sehen ist.

Größere Modifikationen sind z. B. Isoprenylierungen, Glykosylierungen, Ubiquitinierungen und Sumoylierungen. Isoprenylierungen konnten allerdings bisher nur an Membranproteinen nachgewiesen werden und kommen deshalb als mögliche Modifikation von Efg1p nicht in Frage, obwohl dies nicht ausgeschlossen werden kann. O-Glykosylierungen durch GlcNAc an Serin/Threonin-Resten konnten z. B. in der Nähe der Transaktivierungsdomäne am T58 von cMyc nachgewiesen werden, wobei ihre genaue Funktion unklar ist (Chou *et al.*, 1995a; Chou *et al.*, 1995b). Auch das bHLH-Protein Sp1 ist O-glykosyliert und vermutlich verändert diese Modifikation die Transkriptionsregulation des Proteins (Kudlow, 2006). Auf Grund der veränderten Laufhöhe und der Ähnlichkeit zu dem Transkriptionsfaktor cMyc ist die

Glykosylierung eine mögliche Modifikation von Efg1p. Sonneborn (1999) konnte jedoch mit Hilfe eines GlcNAc-Antikörpers ausschließen, dass Efg1p durch GlcNAc *O*-glykosyliert wird. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass Efg1p durch andere Zucker modifiziert wird. Ob Efg1p glykosyliert ist, kann aber erst nach einer massenspektroskopischen Analyse mit Sicherheit gesagt werden.

Neben dieser Glykosylierung werden häufig an Transkriptionsfaktoren Ubiquitinierungen und Sumoylierungen beobachtet. Die Ubiquitinierung ist bedeutend für den Abbau von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myc, c-Jun, c-Fos (Treier *et al.*, 1994; Stancovski *et al.*, 1995; Gregory und Hann, 2000). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines Ubiquitin-Antikörpers ausgeschlossen werden, dass Efg1p durch Ubiquitin modifiziert ist. Eine weitere Ubiquitin-ähnliche Modifikation ist die Sumoylierung von Proteinen, die unter anderem zu einer Veränderung der Funktion, der Stabilität, und auch zu einem Wechsel der zellulären Lokalität zur Folge haben kann (Kikuchi *et al.*, 2006). Diese Modifizierung konnte aber durch ein Epitop-markiertes HA-Smt3-Fusionsprotein ausgeschlossen werden. Das Plasmid, das für ein Epitop markiertes HA-Smt3-Fusionsprotein kodiert, wurde in einen Wildtyp-Stamm transformiert und über eine Immunoblot-Analyse untersucht. In diesem Stamm konnte das Smt3p nicht in der Höhe des Efg1p nachgewiesen werden. Somit verliefen die Untersuchungen von Efg1p auf eine Ubiquitinierung und eine Sumoylierung negativ. Zusammenfassend konnte daher in dieser Arbeit nicht geklärt werden, welche Modifikationen am Efg1p zu einem veränderten elektrophoretischen Laufverhalten um ca. 30 kDa führen. Zu diesem Zweck müsste Efg1p isoliert und massenspektroskopisch analysiert werden.

#### 4.7 Vorversuche zur Isolierung von Efg1p

In dieser Arbeit wurde mit Versuchen begonnen, das Efg1-Protein zu isolieren, um es massenspektroskopisch zu analysieren. Neben der Isolierung des Efg1p-Proteins sollten dadurch auch Interaktionspartnern von Efg1p identifiziert werden.

Mit Hilfe einer HA-Affinitätsmatrix wurde eine Isolierung von Efg1p und möglichen Interaktionspartnern vorgenommen. Dieses gestaltete sich jedoch sehr schwierig, da Efg1p zwar angereichert werden konnte, aber die Konzentration für eine Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue nicht ausreichend war. Des Weiteren konnte man am Coomassie gefärbten SDS-Gel sehen, dass die Aufreinigung an sich sehr schlecht verlaufen war, da die aufgetragene Elutionsfraktion ein sehr vielfältiges Bandenmuster zeigte (Abb. 41). Möglicherweise waren die Waschschriffe unzureichend oder es müssten andere Puffer untersucht werden, um die Aufreinigung zu verbessern. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit, wären Vorreinigungsschritte durch unterschiedliche Methoden. In dieser Arbeit wurden hierfür bereits unterschiedliche Säulensysteme getestet und als mögliche Vorreinigungssäulen eine Heparin- und eine Kationenaustauschersäule in Erwägung gezogen. So könnte ein Rohextrakt über die Kationenaustauscher- und Heparin-Säule vorgereinigt werden und das Efg1-Protein durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Möglicherweise könnte ein zweites Epitop am HA-Efg1-Fusionprotein (z. B. ein V5-Epitop) die Reinigung erleichtern, wie es beim TAP (Tandem-Affinity-Purification)-Epitop beschrieben wird. Proteine mit diesem Epitop können über zwei verschiedene Affinitätssäulen gereinigt werden, wodurch eine effiziente Reinigung von Proteinen möglich ist (Knuesel *et al.*, 2006).

## 5 Zusammenfassung

Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* passt sich durch verschiedene Wachstumsformen an den menschlichen Wirt an und erhöht dadurch seine Pathogenität. Hierbei hat der Transkriptionsfaktor Efg1p eine wichtige Bedeutung, da er die Ausbildung von Hefe-, Hyphen- und Pseudohyphen-Zellformen, sowie die Induktion von Chlamydosporen und den Phänotypwechsel von *opaque*- zu *white*-Zellformen erlaubt. Efg1p gehört zur Gruppe der APSES-Transkriptionsfaktoren, die die zelluläre Differenzierung in Pilzen steuern. Diese Proteine enthalten eine hoch konservierte „APSES-Domäne“, die ein „basic helix-loop-helix“ (bHLH)-Motiv enthält. Efg1p besitzt außerdem an den N- und C-terminalen Enden Glutaminreiche Regionen. Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Beziehungen zwischen Struktur und Funktion des Efg1-Proteins. Hierfür wurden durch eine systematische Mutagenese des *EFG1*-Gens *C. albicans*-Stämme konstruiert, die unterschiedliche Efg1p-Varianten produzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die APSES-Domäne für die unterschiedlichen zellmorphologischen Phänotypen eine essentielle Funktion hat. Bei ihrem Fehlen wurde die Hefeform nicht korrekt ausgebildet, sondern es entstanden stäbchenförmige Zellen; außerdem wurden weder echte Hyphen, noch Pseudohyphen ausgebildet. Zusätzlich zur APSES-Domäne waren für die Morphogenese von Chlamydosporen auch beide Glutaminreichen terminalen Domänen notwendig, während für den Wechsel von der *opaque*- zur *white*-Zellform zusätzlich die C-terminale Glutaminreiche Domäne in ihrer Gesamtheit benötigt wurde.

Als globaler Regulator zeigt Efg1p eine duale Funktionsweise und kann als Aktivator und als Repressor wirken. Für die Hypheninduktion agiert Efg1p als Aktivator, der aber nach dem Beginn der Hyphenbildung sein eigenes Transkript durch negative Autoregulation des *EFG1*-Promotors reprimiert. Durch ein Ein-Hybrid-Experiment mit den Efg1p-Varianten in *C. albicans* konnte aufgeklärt werden, dass die N-terminale Glutaminreiche Domäne und ein C-terminaler Bereich der APSES-Domäne für die Repressor-Aktivität benötigt wird.

Immunoblot-Analysen zeigten, dass Efg1p in der Gelelektrophorese statt mit der theoretischen Molekularmasse von 61 kDa als eine Dreifachbande um 90 kDa läuft. Die Dreifachbande und der Massenunterschied wird zum Teil durch Phosphorylierung, aber hauptsächlich durch noch unbekannt posttranslationale Modifikationen hervorgerufen. Durch die Efg1p-Deletionsvarianten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Efg1-Proteins ausbleibt, wenn die bHLH-Domäne fehlt und dass auch der Hauptanteil der weiteren, noch unbekannt Modifikationen von der bHLH-Domäne abhängt bzw. in ihr lokalisiert ist.

Da Efg1p als zentraler Regulator verschiedene funktionelle Domänen für seine Aktivität benötigt und vermutlich außer durch Modifikationen durch interagierende Proteine seine Spezifität reguliert, wurde mit Vorversuchen zur Reinigung von Efg1p aus einem *C. albicans* Rohextrakt begonnen. Hierbei zeigte sich, dass für eine effektive Reinigung eine Affinitätschromatographie nicht ausreichend ist, sondern Vorreinigungen durch eine Heparin- bzw. eine Kationenaustauschersäule notwendig sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Giagtzoglou, N., Yallampalli, S., David, G., He, Y., Delidakis, C., and Bellen, H.J. (2006).** Senseless physically interacts with proneural proteins and functions as a transcriptional co-Activator. *Development* 133, 1979-1989.
- Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R., and Metzner, R. (1996).** Asm-1+, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* 144, 991-1003.
- Ayer, D.E., and Eisenman, R.N. (1993).** A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* 7, 2110-2119.
- Berger, S.L., Cress, W.D., Cress, A., Triezenberg, S.J., and Guarente, L. (1990).** Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of Vp16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61, 1199-1208.
- Bergstrom, D.A., and Tapscott, S.J. (2001).** Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol* 21, 2404-2412.
- Bernards, R. (1995).** Transcriptional regulation. flipping the Myc switch. *Curr Biol* 5, 859-861.
- Bernstein, B.E., Tong, J.K., and Schreiber, S.L. (2000).** Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13708-13713.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bockmühl, D.P. (2001).** Regulation der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch Komponenten eines cAMP-abhängigen Signalweges, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- Bockmühl, D.P., and Ernst, J.F. (2001).** A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* 157, 1523-1530.
- Bockmühl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A., and Ernst, J.F. (2001).** Distinct and redundant roles of the two protein kinase a isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 42, 1243-1257.
- Borneman, A.R., Hynes, M.J., and Andrianopoulos, A. (2002).** A basic Helix-Loop-Helix protein with Ssimilarity to the fungal morphological regulators, Phd1p, Efg1p and StuA, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffeii*. *Mol Microbiol* 44, 621-631.
- Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X., and Johnson, A.D. (2000).** Identification and characterization of *Tup1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156, 31-44.
- 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.
- Bußmann, M. (2006).** Untersuchung zur Zielsequenz-Erkennung des Transkriptionsregulators Efg1p aus *Candida albicans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Calderone, R.A., and Braun, P.C. (1991).** Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55, 1-20.

- Cao, F., Lane, S., Raniga, P.P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., Chen, J., and Liu, H. (2006).** The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 17, 295-307.
- Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L., and Cantore, M.L. (2004).** *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase a displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic Subunit. *Eukaryot Cell* 3, 190-199.
- Cassone, A., Sullivan, P.A., and Shepherd, M.G. (1985).** N-acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiologica* 8, 85-99.
- Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B., and Entian, K.D. (1999).** The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 261, 740-752.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S., and Liu, H. (2002).** A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 46, 1335-1344.
- Chou, T.Y., Dang, C.V., and Hart, G.W. (1995a).** Glycosylation of the c-myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4417-4421.
- Chou, T.Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995b).** c-myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270, 18961-18965.
- Csank, C., Schroppel, 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 Immun* 66, 2713-2721.
- Cutler, J.E. (1991).** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45, 187-218.
- Dai, S., Petruccelli, S., Ordiz, M.I., Zhang, Z., Chen, S., and Beachy, R.N. (2003).** Functional analysis of Rf2a, a rice transcription factor. *J Biol Chem* 278, 36396-36402.
- Davis, D., Wilson, R.B., and Mitchell, A.P. (2000).** Rim101-Dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 20, 971-978.
- Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassar, A.B., and Weintraub, H. (1990).** The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60, 733-746.
- de la Serna, I.L., Ohkawa, Y., Berkes, C.A., Bergstrom, D.A., Dacwag, C.S., Tapscott, S.J., and Imbalzano, A.N. (2005).** MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. *Mol Cell Biol* 25, 3997-4009.
- Dennig, J., Beato, M., and Suske, G. (1996).** An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J* 15, 5659-5667.
- Doedt, T. (2000).** Untersuchung der Regulation und DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors Efg1p aus *Candida albicans*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Doedt, T. (2004).** Transkriptionelle Steuerung von Morphogenese und Metabolismus des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch die APSES-Proteine Efg1p und Efh1p. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmühl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J., and Ernst, J.F. (2004).** APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 15, 3167-3180.
- Dujardin, L., Walbaum, S., and Biguet, J. (1980a).** Chlamydosporulation in *Candida albicans*. course of the morphogenesis; influence of light and sowing density. *Ann Microbiol (Paris)* 131A, 141-149.

- Dujardin, L., Walbaum, S., and Biguet, J. (1980b).** Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydospores in synthetic culture media. *Mycopathologia* 71, 113-118.
- Dutton, J.R., Johns, S., and Miller, B.L. (1997).** StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* 16, 5710-5721.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. (1994).** Crystal structure of transcription factor E47: E-Box recognition by a basic region Helix-Loop-Helix dimer. *Genes Dev* 8, 970-980.
- Enjalbert, B., Nantel, A., and Whiteway, M. (2003).** Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* 14, 1460-1467.
- Ernst, J.F. (2000).** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146 (Pt 8), 1763-1774.
- Faiola, F., Liu, X., Lo, S., Pan, S., Zhang, K., Lymar, E., Farina, A., and Martinez, E. (2005).** Dual regulation of c-Myc by P300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol* 25, 10220-10234.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B., and Fink, G. (1999).** Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181, 6339-6346.
- Ferre-D'Amare, A.R., Prendergast, G.C., Ziff, E.B., and Burley, S.K. (1993).** Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric B/Hlh/Z domain. *Nature* 363, 38-45.
- Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993).** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717-728.
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (2002).** *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the Efg1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* 44, 61-72.
- Gimeno, C.J., and Fink, G.R. (1994).** Induction of pseudohyphal growth by overexpression of Phd1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* 14, 2100-2112.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992).** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and Ras. *Cell* 68, 1077-1090.
- Giniger, E., Varnum, S.M., and Ptashne, M. (1985).** Specific DNA binding of Gal4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.
- 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.
- Goettsch, S., and Bayer, P. (2002).** Structural attributes in the conjugation of ubiquitin, SUMO and RUB to protein substrates. *Front Biosci* 7, a148-162.
- Golemis, E.A., and Khazak, X. (1994).** Alternative yeast two-hybrid system: the interaction trap and interaction mating. *Methods in Molecular Biology Chapter* 60.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J.J., and Madjar, J.J. (1997).** Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* 18, 328-337.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000).** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J. (2004).** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.

- Gow, N.A., Brown, A.J., and Odds, F.C. (2002).** Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5, 366-371.
- Greenspan, D., and Greenspan, J.S. (1996).** HIV-related oral disease. *Lancet* 348, 729-733.
- Gregory, M.A., and Hann, S.R. (2000).** c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 20, 2423-2435.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002).** Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.
- Hilbig, J. (2004).** Untersuchungen zur DNA-Spezifität des morphologischen Regulators Efg1p des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Heinrich-Heine-Universität.
- Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D., Roberts, R.C., and van Oostrum, J. (2002).** Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics* 2, 127-134.
- Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M., and Scherer, S. (1998).** *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* 33, 451-459.
- Huang, Z., Traugh, J.A., and Bishop, J.M. (2004).** Negative Control of the Myc Protein by the Stress-Responsive Kinase Pak2. *Mol Cell Biol* 24, 1582-1594.
- Jayaraman, P.S., Hirst, K., and Goding, C.R. (1994).** The activation domain of a basic helix-loop-helix protein is masked by repressor interaction with domains distinct from that required for transcription regulation. *Embo J* 13, 2192-2199.
- Jensen, O.N. (2004).** Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 8, 33-41.
- Johnson, S.E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E.J., and Konieczny, S.F. (1996).** Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation. *Mol Cell Biol* 16, 1604-1613.
- Joshi, K.R., Solanki, A., and Prakash, P. (1993).** Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* 36, 48-52.
- Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2001).** Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator *Rox1*, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 21, 2496-2505.
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1997).** Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89, 365-371.
- Khoudoli, G.A., Porter, I.M., Blow, J.J., and Swedlow, J.R. (2004).** Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the taguchi approach. *Proteome Sci* 2, 6.
- Kikuchi, A., Kishida, S., and Yamamoto, H. (2006).** Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 38, 1-10.
- Kim, T.S., Kim, H.Y., Yoon, J.H., and Kang, H.S. (2004).** Recruitment of the Swi/Snf complex by Ste12-Tecl promotes Flo8-Mss11-mediated activation of Stal expression. *Mol Cell Biol* 24, 9542-9556.
- Köhler, J.R., and Fink, G.R. (1996).** *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13223-13228.
- Kudlow, J.E. (2006).** Post-translational modification by O-GlcNAc: another way to change protein function. *J Cell Biochem* 98, 1062-1075.

- Kumamoto, C.A., and Vinces, M.D. (2005).** Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7, 1546-1554.
- Kurdistani, S.K., Robyr, D., Tavazoie, S., and Grunstein, M. (2002).** Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. *Nat Genet* 31, 248-254.
- 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.
- Kwon, S.J., Choi, E.Y., Choi, Y.J., Ahn, J.H., and Park, O.K. (2006).** Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *J Exp Bot* 57, 1547-1551.
- Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J., and Soll, D.R. (2003).** Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* 71, 4970-4976.
- 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.
- Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L., and Friedman, T.L. (1975).** Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. *Infect Immun* 11, 1014-1023.
- Lane, S., Birse, C., Zhou, S., Matson, R., and Liu, H. (2001a).** DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* 276, 48988-48996.
- Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q., and Liu, H. (2001b).** The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via Tec1. *Mol Cell Biol* 21, 6418-6428.
- Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y., and Schroppel, K. (2001).** Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 42, 673-687.
- Leng, P., Lee, P.R., Wu, H., and Brown, A.J. (2001).** Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein. *J Bacteriol* 183, 4090-4093.
- Lin, Y.S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D., and Green, M.R. (1991).** Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353, 569-571.
- Liu, H., Kohler, J., and Fink, G.R. (1994).** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* 266, 1723-1726.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997).** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Luscher, B. (2001).** Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 277, 1-14.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., and Pabo, C.O. (1994).** Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.
- Magee, B.B., Legrand, M., Alarco, A.M., Raymond, M., and Magee, P.T. (2002).** Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 46, 1345-1351.

- Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J.M., and Van Dijck, P. (2005).** The G protein-coupled Receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 16, 1971-1986.
- Mann, M., and Jensen, O.N. (2003).** Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21, 255-261.
- Mao, X., Cao, F., Nie, X., Liu, H., and Chen, J. (2006).** The Swi/Snf chromatin remodeling complex is essential for hyphal development in *Candida albicans*. *FEBS Lett* 580, 2615-2622.
- Martens, J.A., and Winston, F. (2003).** Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 136-142.
- Massari, M.E., and Murre, C. (2000).** Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-440.
- McCullough, M.J., Ross, B.C., and Reade, P.C. (1996).** *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25, 136-144.
- McIntosh, E.M. (1993).** MCB elements and the regulation of DNA replication genes in yeast. *Curr Genet* 24, 185-192.
- Meshi, T., and Iwabuchi, M. (1995).** Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol* 36, 1405-1420.
- Miller, J.** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, K.Y., Wu, J., and Miller, B.L. (1992).** StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* 6, 1770-1782.
- Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2002).** White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110, 293-302.
- Mitchell, P.J., and Tjian, R. (1989).** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Miwa, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Yun, C.W., Schell, W.A., Perfect, J.R., Kumagai, H., and Tamaki, H. (2004).** Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3, 919-931.
- Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J., and Brown, A.J. (2001a).** Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors *CaTup1*, *CaMig1* and *CaNrg1*. *Mol Microbiol* 42, 981-993.
- Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaia, F., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F.C., and Brown, A.J. (2001b).** *NRG1* represses yeast-gypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* 20, 4742-4752.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., and et al. (1989).** Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Nagl, N.G., Jr., Zweitzig, D.R., Thimmapaya, B., Beck, G.R., Jr., and Moran, E. (2006).** The c-myc gene is a direct target of mammalian Swi/Snf-related complexes during differentiation-associated cell cycle arrest. *Cancer Res* 66, 1289-1293.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J., and Hube, B. (2003).** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 400-428.

- Neely, K.E., Hassan, A.H., Brown, C.E., Howe, L., and Workman, J.L. (2002). Transcription activator interactions with multiple Swi/Snf subunits. *Mol Cell Biol* 22, 1615-1625.
- Neuhold, L.A., and Wold, B. (1993). HLH forced dimers: tethering MyoD to E47 generates a dominant positive myogenic factor insulated from negative regulation by Id. *Cell* 74, 1033-1042.
- Odds, F.C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 31, S2-5.
- Odds, F.C., Webster, C.E., Mayuranathan, P., and Simmons, P.D. (1988). *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 26, 277-283.
- Parker, D., Jhala, U.S., Radhakrishnan, I., Yaffe, M.B., Reyes, C., Shulman, A.I., Cantley, L.C., Wright, P.E., and Montminy, M. (1998). Analysis of an activator:coactivator complex reveals an essential role for secondary structure in transcriptional activation. *Mol Cell* 2, 353-359.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A., and McMahon, S.B. (2004). The c-myc oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases Hgc5/Pcaf and Tip60. *Mol Cell Biol* 24, 10826-10834.
- Pfaller, M.A. (1996). Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 22 Suppl 2, S89-94.
- Pugh, B.F., and Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A., and Fink, G.R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5984-5988.
- Robinson, K.A., and Lopes, J.M. (2000). Survey and summary: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res* 28, 1499-1505.
- Rocha, C.R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 12, 3631-3643.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY.
- Schröppel, K., Sprosser, K., Whiteway, M., Thomas, D.Y., Rollinghoff, M., and Csank, C. (2000). Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun* 68, 7159-7161.
- Seo, J., and Lee, K.J. (2004). Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37, 35-44.
- Setiadi, E. (2002). Charakterisierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase Rim15p des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Diplomarbeit, 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.
- Sharkey, L.L., McNemar, M.D., Saporito-Irwin, S.M., Sypherd, P.S., and Fonzi, W.A. (1999). *HWPI* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* 181, 5273-5279.

- Sheppard, D.C., Doedt, T., Chiang, L.Y., Kim, H.S., Chen, D., Nierman, W.C., and Filler, S.G. (2005).** The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence. *Mol Biol Cell* 16, 5866-5879.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B. (1986).** Laboratory course manual for methods in yeast genetics.: Cold Spring Harbour, NY.
- Sherwood, J., Gow, N.A., Gooday, G.W., Gregory, D.W., and Marshall, D. (1992).** Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol* 30, 461-469.
- Shimizu, M., Takahashi, K., Lamb, T.M., Shindo, H., and Mitchell, A.P. (2003).** Yeast Ume6p repressor permits activator binding but restricts TBP binding at the *HOP1* promoter. *Nucleic Acids Res* 31, 3033-3037.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., and Soll, D.R. (1987).** "White-opaque Transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169, 189-197.
- Smith, A., Ward, M.P., and Garrett, S. (1998).** Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *Embo J* 17, 3556-3564.
- Sobel, J.D. (1997).** Vaginitis. *N Engl J Med* 337, 1896-1903.
- Sonneborn, A. (1999).** Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Efg1p und der Proteinkinase A (Catp2p) für die Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., and Ernst, J.F. (1999a).** Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67, 5514-5517.
- Sonneborn, A., Tebarth, B., and Ernst, J.F. (1999b).** Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67, 4655-4660.
- Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K., and Soll, D.R. (2000).** Efg1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J Bacteriol* 182, 1580-1591.
- Stancovski, I., Gonen, H., Orian, A., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1995).** Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system *in vivo* and *in vitro*: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol Cell Biol* 15, 7106-7116.
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E., and Ernst, J.F. (1997).** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* 16, 1982-1991.
- Suckow, P.E., and Hollenberg, C.P. (1998).** The activation specificities of wild-type and mutant Gcn-4p *in vivo* can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 276, 887-902.
- Sundstrom, P. (2002).** Adhesion in *Candida* Spp. *Cell Microbiol* 4, 461-469.
- Tanaka, M., Clouston, W.M., and Herr, W. (1994).** The Oct-2 glutamine-rich and proline-rich activation domains can synergize with each other or duplicates of themselves to activate transcription. *Mol Cell Biol* 14, 6046-6055.
- Tapscott, S.J. (2005).** The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *development* 132, 2685-2695.
- Tebarth, B. (2001).** Regulation der Expression des *EFG1*-Gens in der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*, Heinrich-Heine-Universität.

- Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A., and Ernst, J.F. (2003).** Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *Efg1* gene. *J Mol Biol* 329, 949-962.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Treier, M., Staszewski, L.M., and Bohmann, D. (1994).** Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the delta domain. *Cell* 78, 787-798.
- Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2003).** Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* 115, 389-399.
- Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A.J., and Verdine, G.L. (1997).** Induced alpha helix in the Vp16 activation domain upon binding to a human Taf. *Science* 277, 1310-1313.
- Vinces, M.D., Haas, C., and Kumamoto, C.A. (2006).** Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene *CZF1* and its regulation by Efg1p and Czf1p. *Eukaryot Cell* 5, 825-835.
- Voronova, A., and Baltimore, D. (1990).** Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein MAP to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4722-4726.
- Walsh C.T., G.-T.S.u.G.G.J. (2005).** Posttranslationale Proteinmodifikation: Die Chemie Der Proteomdiversifizierung. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R., and Garrett, S. (1995).** Sok2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* 15, 6854-6863.
- Watt, K., Jess, T.J., Kelly, S.M., Price, N.C., and McEwan, I.J. (2005).** Induced alpha-helix structure in the aryl hydrocarbon receptor transactivation domain modulates protein-protein interactions. *Biochemistry* 44, 734-743.
- Wendt, H., Thomas, R.M., and Ellenberger, T. (1998).** DNA-mediated folding and assembly of MyoD-E47 heterodimers. *J Biol Chem* 273, 5735-5743.
- 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.
- Whiteway, M., Dignard, D., and Thomas, D.Y. (1992).** Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9410-9414.
- 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.
- Zheng, X., and Wang, Y. (2004).** Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *Embo J* 23, 1845-1856.
- Zorbas, F.L.H. (1998).** Bioanalytik. Spektrum, Akad. Verl.
- Zordan, R.E., Galgoczy, D.J., and Johnson, A.D. (2006).** Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12807-12812.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	min	Minuten
μ	mikro	ml	Milliliter
A	Adenin	mM	Millimolar
Abb.	Abbildung	MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
Ac	Acetat	mRNA	messenger RNA
AD	Aktivierungsdomäne	nm	Nanometer
Amp	Ampicillin	OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei λ = x nm
AP	Alkalische Phosphatase	ONPG	o-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid
APS	Ammoniumpersulfat	ORF	offener Leserahmen
ARS	Autonom replizierende Sequenz	PAA	Polyacrylamid
AS	Aminosäure	PBS	Phosphate buffered saline
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	<i>PCK1p</i>	<i>PCK1</i> -Promotor
b (bp)	Basen (Basenpaare)	PCR	'polymerase chain reaction'
BD	DNA-Bindedomäne	PEG	Polyethylenglycol
bHLH	basic Helix-Loop-Helix	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
bidest.	bidestilliert	PKA	Proteinkinase A
BSA	Rinderserumalbumin	PMSF	Phenylmethyl-Sulfonyl Fluorid
bzw.	beziehungsweise	POD	Peroxidase
C	Cytosin	RNA	Ribonukleinsäure
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	RNase	Ribonuklease
CASA	Casaminosäuren	mRNA	messenger RNA
cDNA	komplementäre DNA	rRNA	ribosomale RNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	RT	Raumtemperatur
DMSO	Dimethylsulfoxid	s	Sekunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
dNTP	Desoxynukleotid	SDS	Natriumdodecylsulfat
DTT	1,4-Dithiothreitol	ss	Einzelstrang
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SSC	standard saline citrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	β-Gal	β-Galaktosidase
Efg1p	Efg1-Protein	SSPE	saline sodiumphosphat-EDTA
Efh1p	Efh1-Protein	T	Thymidin
Fa.	Firma	Tab.	Tabelle
g	Gramm	TAE	Tris-Acetat-EDTA
G	Guanin	TBE	Tris-Borat-EDTA
h	Stunde	TE	Tris-EDTA
HA	Hämagglutinin	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
IP	Immunpräzipitation	u	units
kb	Kilobasenpaare	u.a.	unter anderem
kDa	Kilodalton	Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>LacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>	vgl.	vergleiche
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani		
M	Molar		
MAP	mitogen activated protein		
MCB	<i>MluI</i> cell cycle box		
MCS	multiple cloning site		

---

X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YCB	Yeast carbon base
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

**Ein- und Dreibuchstabencodes für****Aminosäuren**

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

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle besonders beim Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Überlassung dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Danke auch für Möglichkeiten kleine und große Nebenaktivitäten machen zu können.

Beim Herrn Prof. Dr. R. Freudl möchte ich mich herzlichst für die Übernahme des Korefferats bedanken.

Ein gaaaaanz lieber Dank geht natürlich an meine Lieblings-AG Ernst/Lengeler. Es war so schön mit Euch zu arbeiten (ich hoffe, das bleibt auch weiterhin so), zu lachen und natürlich auch inhaltsträchtige Gespräche über die Forschung zu machen ☺ An meine Laborhälfte: „Super, dass Du mich an Land gezogen hast und danke für die vielen freundschaftlichen Gespräche, sowohl privat als auch fachlich!“. Klaus: Ich bin so froh, dass Du Dich durch meine Arbeit gequält hast! Fabien: Danke für die vielen fachlichen Gespräche!!! Vielen Dank auch an alle Mitglieder des Mibi-Institutes und der lieben Anna für die netten Gespräche und lustigen Aktivitäten.

Bei Dr. Sabine Metzger, Nadine Dyballa und Dr. Katrin Henze möchte ich mich ganz herzlich für die nette und geduldige Einführung in die 2D-Gelelektrophorese und für die ständige Diskussionsbereitschaft bei meinen „Problemchen“ bedanken.

Danke auch der AG Alfermann, die mich nie im Stich gelassen hat und mich mit irgendwelchen Geräten, sei es Gasventil oder ähnliches, ausstatten musste.

Özlem, danke für Deine Freundschaft und die aufpöppelnden Gespräche, wenn ich mal wieder nicht weiter wusste und natürlich für die Einführung in die *in vitro*-Translation. Das waren noch Zeiten!!!

Ein ganz lieber und großer Dank geht an meine Mutter.....Arigato okaasan!!! Iroiro hontoni kansha shiteiru yo!

Ein lieber Dank geht natürlich auch an meinen Super-Schatzi, der mich immer, egal um was es geht, unterstützt. Danke, dass es Dich gibt!!!!

## 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 6.11.06