

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	9
Summary	10
Einleitung	11
1 <i>Candida albicans</i> als Humanpathogen – Epidemiologie und Therapie.....	12
2 <i>Candida albicans</i> – Biologie	16
3 Virulenzmechanismen von <i>Candida albicans</i>	28
3.1 Morphogenese	29
3.2 Sezernierte Proteine.....	31
3.3 Zelloberflächenmoleküle.....	33
4 Pry-Proteine in <i>Candida albicans</i>	36
5 Ziel dieser Arbeit.....	40
Material und Methoden.....	41
1 Chemikalien	41
2 Enzyme	41
3 Reaktions-Kits.....	41
4 Kulturmedien.....	42
5 Pufferlösungen.....	44
6 Oligonukleotide	45
7 Plasmide	47
8 Bakterienstämme.....	48
9 <i>Candida albicans</i> -Stämme	49
10 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	51
11 Humane Zell-Linien.....	51
12 Allgemeine Methoden	52
12.1 Datenbanken und Datenverarbeitung	52
12.2 Kultivierung von Bakterienstämmen.....	53
12.3 Kultivierung von <i>C. albicans</i>	53
12.4 Transformation	54
12.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	54
12.4.2 Transformation von <i>C. albicans</i>	54
12.5 Methoden für die Analyse von DNA.....	56
12.5.1 Klonierung	56
12.5.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	56
12.5.3 Präparation genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	56
12.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
12.5.5 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen über <i>Southern Blot</i> -Analyse	58
12.6 Methoden für die Analyse von RNA.....	60
12.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i>	60
12.6.2 Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen über <i>Northern Blot</i> -Analyse	61

12.6.3	Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen über quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	62
12.7	Methoden für die Analyse von Proteinen	64
12.7.1	Gewinnung von Rohextrakten aus Hefe	64
12.7.2	Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen	64
12.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	65
12.7.4	Färbung von Proteinen	66
12.7.5	Nachweis spezifischer Proteine über <i>Western Blot</i> -Analyse	67
13	Spezielle Methoden	68
13.1	Promotoranalyse <i>RBE1</i>	68
13.2	Filtertests	69
13.3	Heterologe Expression von <i>EFG1</i> in <i>E. coli</i>	70
13.4	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Efg1p	71
13.5	Bindungsstudien (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSAs)	73
13.6	Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in <i>C. albicans</i> - Sekretomanalysen	75
13.7	Heterologe Expression von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>S. cerevisiae</i>	77
13.8	Protease-Versuche	78
13.9	Deletion von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>C. albicans</i>	78
13.10	Überexpression von <i>RBE1</i> in <i>C. albicans</i>	80
13.11	Adhäsions- und Invasionstests	80
13.11.1	Quantitative Adhäsionstests	81
13.11.2	Invasionstests	82
13.11.3	Zytotoxizitätstests	83
13.12	Paarungsversuche	84
13.13	Virulenzstudien	85
14	Methoden für die <i>de novo</i> -identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine	85
14.1	Gewinnung von Kernproteinen aus <i>C. albicans</i>	85
14.2	Anreicherung DNA-bindender Proteine mittels Heparin-Affinitätschromatographie	87
	Ergebnisse	88
1	Die Pry-Proteinfamilie in <i>Candida albicans</i>	88
	Strukturelle Charakteristika der Pry-Proteine	89
	Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen der Pry-Proteine in Pilzen	91
2	Transkriptionelle Regulation der PRY-Gene in <i>Candida albicans</i>	96
2.1	Expression von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i>	96
2.2	Expression aller Mitglieder der PRY-Familie in <i>C. albicans</i>	99
	Regulation der PRY-Gene in Blastosporen versus Hyphen	99
	Kinetik der Regulation der PRY-Gene in frühen Stadien der Hyphenbildung	101
	Regulation der PRY-Gene in white- versus opaque-Zellen	102
3	Promotoranalyse des PRY-Gens <i>RBE1</i>	107
3.1	Identifikation eines <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	107
	Konstruktion der Reporterplasmide	107
3.2	Identifikation der regulatorischen Domänen innerhalb des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	111
	Identifikation der Aktivierungsdomäne des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	112
	Identifikation der Reprimierungsdomäne des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	113

3.3	Bindung heterolog exprimierter Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Domänen des <i>RBE1</i> -Promotors	115
	<i>Heterologe Expression von Efg1p</i>	120
	<i>Bindungsstudien mit rekombinantem Efg1p</i>	123
	<i>Bindungsstudien mit rekombinantem Tec1p</i>	125
4	Funktionelle Charakterisierung von Rbe1p und Rbt4p.....	127
4.1	Lokalisation von Rbe1p und Rbt4p in <i>C. albicans</i> -vergleichende Sekretomanalysen	127
4.2	Protease-Assays mit heterolog exprimiertem Rbe1p und Rbt4p	131
	<i>Heterologe Expression von Rbe1p und Rbt4p in S. cerevisiae</i>	133
	<i>Protease-Assays</i>	136
	<i>Spaltungsversuche</i>	138
4.3	Deletion von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>C. albicans</i>	139
	<i>Konstruktion der Einzel-Deletions- und Reversionsstämme für RBE1 und RBT4</i>	140
	<i>Konstruktion der Doppel-Deletions- und Reversionsstämme für RBE1 und RBT4</i>	143
4.4	Phänotypische Charakterisierung der <i>RBE1</i> - und <i>RBT4</i> -Deletionsstämme.....	144
	<i>Wachstumsbedingungen</i>	144
	<i>Adhäsion in vitro</i>	145
	<i>Invasion in vitro</i>	147
	<i>Zyotoxizitätstests</i>	148
	<i>Beteiligung von Rbe1p und Rbt4p an der Paarung von C. albicans</i>	150
	<i>Virulenzstudien in vivo</i>	153
	<i>Transkriptionelle Regulation der PRY-Gene in den Deletionsstämmen</i>	155
	Diskussion	157
1.	Eine neue Familie von Pry-Proteinen in <i>C. albicans</i>	158
2.	Die Familie der <i>PRY</i> -Gene wird während der Morphogenese von <i>C. albicans</i> differentiell reguliert.....	159
3.	Der Minimalpromotor von <i>RBE1</i> besitzt eine Länge von 1 kb und beinhaltet eine aktivierende und eine reprimierende Domäne.....	165
4.	Regulatorische Domänen innerhalb des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors weisen konservierte Bindemotive für Regulatoren der Morphogenese und der Paarung auf	166
5.	Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sind sekretierte Proteine in <i>C. albicans</i>	170
6.	Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p besitzen keine proteolytische Aktivität	172
7.	Die Pry-Proteine Rbe1p und Rbt4p sind nicht an der Pheromon-vermittelten Ausbildung von Paarungsstrukturen beteiligt.....	177
8.	Die <i>PRY</i> -Gene <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> sind in einem klinischen <i>C. albicans</i> -Isolat nicht an der Filamentierung sowie der Adhäsion und Invasion <i>in vitro</i> beteiligt.....	180
9.	Die <i>PRY</i> -Gene <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> zeigen in einem klinischen Isolat von <i>C. albicans</i> einen synergistischen Virulenzphänotyp.....	183
10.	Mögliche Funktionen der Pry-Proteine bei der systemischen Infektion in <i>C. albicans</i>	184
	Literaturverzeichnis	187
	Anhang	211
	Eine Methode zur <i>de novo</i> -Identifikation spezifisch Promotor-bindender Proteine	228
	Danksagung	236
	Lebenslauf	237
	Publikationen	238
	Erklärung	239

