

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 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i>	56
12.5.3 Präparation genomicscher 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 Rbelp 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 Kemproteinen 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
	<i>Strukturelle Charakteristika der Pry-Proteine</i>	89
	<i>Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen der Pry-Proteine in Pilzen</i>	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
	<i>Regulation der PRY-Gene in Blastosporen versus Hyphen</i>	99
	<i>Kinetik der Regulation der PRY-Gene in frühen Stadien der Hyphenbildung</i>	101
	<i>Regulation der PRY-Gene in white- versus opaque-Zellen</i>	102
3	Promotoranalyse des PRY-Gens <i>RBE1</i>	107
3.1	Identifikation eines <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	107
	<i>Konstruktion der Reporterplasmide</i>	107
3.2	Identifikation der regulatorischen Domänen innerhalb des <i>RBE1</i> -Minimalpromotors	111
	<i>Identifikation der Aktivierungsdomäne des RBE1-Minimalpromotors</i>	112
	<i>Identifikation der Reprimierungsdomäne des RBE1-Minimalpromotors</i>	113

3.3 Bindung heterolog exprimierter Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Domänen des <i>RBE1</i> -Promotors	115
<i>Heterologe Expression von Efg1p</i>	120
Bindungsstudien mit rekombinantem <i>Efg1p</i>	123
Bindungsstudien mit rekombinantem <i>Tec1p</i>	125
4 Funktionelle Charakterisierung von <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i>	127
4.1 Lokalisation von <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i> in <i>C. albicans</i> -vergleichende Sekretomanalysen	127
4.2 Protease-Assays mit heterolog exprimiertem <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i>	131
<i>Heterologe Expression von Rbe1p und Rbt4p in S. cerevisiae</i>	133
Protease-Assays	136
Spaltungsversuche	138
4.3 Deletion von <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i> in <i>C. albicans</i>	139
Konstruktion der Einzel-Deletions- und Reversionsstämme für <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i>	140
Konstruktion der Doppel-Deletions- und Reversionsstämme für <i>RBE1</i> und <i>RBT4</i>	143
4.4 Phänotypische Charakterisierung der <i>RBE1</i> - und <i>RBT4</i> -Deletionsstämme	144
Wachstumsbedingungen	144
Adhäsion <i>in vitro</i>	145
Invasion <i>in vitro</i>	147
Zytotoxizitätstests	148
Beteiligung von <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i> an der Paarung von <i>C. albicans</i>	150
Virulenzstudien <i>in vivo</i>	153
Transkriptionelle Regulation der <i>PRY</i> -Gene in den Deletionsstämmen	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 <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i> sind sekretierte Proteine in <i>C. albicans</i>	170
6. Die Pry-Proteine <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i> besitzen keine proteolytische Aktivität	172
7. Die Pry-Proteine <i>Rbe1p</i> und <i>Rbt4p</i> 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 Vimlenzphänotyp	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

