

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	IV-VIII
ZUSAMMENFASSUNG	IX-XII
SUMMARY	XIII-XV
I. EINLEITUNG	1-19
I.1. <i>Candida albicans</i> ist ein opportunistischer Pathogen.....	2
I.2. <i>C. albicans</i> verfügt über eine Reihe von Virulenzfaktoren.....	3
I.2.1. Phänotypischer Wechsel.....	3
I.2.2. Adhäsion.....	4
I.2.3. Molekulares Mimikry.....	5
I.2.4. Oberflächenhydrophobizität.....	5
I.2.5. Dimorphismus.....	6
I.2.6. Sekretorische Hydrolasen.....	9
I.3. Sekretorische Aspartat-Proteasen.....	10
I.3.1. Die wichtigsten Entdeckungen.....	10
I.3.2. Struktur und Prozessierung der Sap-Proteasen.....	12
I.3.3. Eigenschaften der Sap-Proteasen.....	13
I.3.4. Expression von <i>SAP</i> -Genen <i>in vitro</i>	14
I.3.5. Expression der <i>SAP</i> -Gene <i>in vivo</i> und im RHE-Modell.....	15
I.3.6. Auswirkung der Deletionen der <i>SAP</i> -Gene auf die Virulenz von <i>C. albicans</i>	16
I.4. Ziel der Arbeit.....	18
II. MATERIAL UND METHODEN	20-53
II.1. Organismen und Plasmide.....	21
II.2. Medien.....	23
II.3. Puffer.....	25
II.3.1. Citrat-Puffer.....	25
II.3.2. Kaliumphosphat-Puffer.....	26
II.4. Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	26
II.4.1. Anzucht von <i>E. coli</i>	26

II.4.2. Anzucht von <i>Candida sp.</i>	27
II.4.3. Myzelinduktion bei <i>C. albicans</i>	28
II.4.4. Infektionsmodelle von <i>C. albicans</i>	28
II.5. Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	29
II.5.1. Arbeiten mit RNA.....	29
II.5.1.1. RNA-Isolierung aus Zellkulturen.....	30
II.5.1.2. Isolierung von RNA aus infizierten Organen.....	30
II.5.1.3. RNA-Fällung.....	31
II.5.1.4. RNA-Auftrennung.....	31
II.5.1.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	32
II.5.1.6. Herstellung von cDNA aus <i>Candida</i> -Zellkulturen.....	32
II.5.1.7. Herstellung von cDNA aus infizierten Organen.....	33
II.5.2. Arbeiten mit DNA.....	34
II.5.2.1. Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> -Zellen im großen Maßstab	34
II.5.2.2. Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> -Zellen im kleinen Maßstab (TENS-Method).....	35
II.5.2.3. Präparation genomischer DNA aus <i>Candida sp.</i> im großen Maßstab.....	36
II.5.2.4. Präparation genomischer DNA aus <i>C. albicans</i> im kleinen Maßstab.....	37
II.5.2.5. Phenol / Chloroform-Extraktion von DNA.....	37
II.5.2.6. Fällung von DNA aus Lösungen.....	37
II.5.2.7. Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	38
II.5.2.8. Agarosegelelektrophorese.....	38
II.5.2.9. Eluieren von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel.....	39
II.5.2.10. DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
II.5.2.11. Polymerase-Ketten-Reaktion.....	40
II.5.2.12. Southern-Blot.....	42
II.5.2.13. Kolonie-Hybridisierung.....	44
II.5.2.14. Sequenzierung.....	45
II.5.2.15. Dephosphorelierung von linearisierten Vektoren.....	46
II.5.2.16. Ligation.....	46
II.5.2.17. Elektroporation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	47

II.5.2.18. Gezielte Mutagenese von <i>C. albicans</i>	48
II.5.2.19. Transformation von <i>C. albicans</i>	49
II.5.2.19.1. Protoplastierung von <i>C. albicans</i> -Zellen und Transformation mittels PEG-Behandlung.....	49
II.5.2.19.2. Transformation von <i>C. albicans</i> nach Lithiumacetat-Behandlung.....	50
II.5.2.20. FOA-Behandlung von <i>C. albicans</i> -Transformanten.....	50
II.5.3. Arbeiten mit Proteinen.....	51
II.5.3.1. Expression von rekombinierten Proteinen in <i>P. pastoris</i>	51
II.5.3.2. Auftrennung von Proteinen im Gel.....	52
II.5.3.3. Bestimmung der Protein-Konzentration.....	52
II.5.3.4. Proteaseaktivitätstest.....	53
II.5.3.5. Bestimmung der Substratspezifität von Proteasen.....	53
III. ERGEBNISSE.....	54-107
III.1. Untersuchung des Expressionsmusters der <i>SAP</i> -Genfamilie.....	55
III.1.1. Expression der <i>SAP</i> -Genfamilie <i>in vitro</i>	55
III.1.1.1. Die Transkription von <i>SAP</i> -Genen kann von vielen Umgebungsfaktoren beeinflusst werden.....	55
III.1.1.1.1. Das Expressionsmuster der <i>SAP</i> -Gene unterscheidet sich bei Myzelinduktion in verschiedenen Medien.....	56
III.1.1.1.2. Protein als einzige Stickstoffquelle fördert die Expression der <i>SAP</i> -Gene.....	58
III.1.1.1.3. Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle verändert die <i>SAP</i> -Expression.....	58
III.1.1.1.4. Regulation der <i>SAP</i> -Expression beim "Switching".....	60
III.1.1.2. <i>SAP4-6</i> werden von einer hyphendefizienten $\Delta efg1 / \Delta cph1$ - Mutante im myzelinduzierenden Medium exprimiert.....	62
III.1.2. Expression der <i>SAP</i> -Gene <i>in vivo</i> und deren Bedeutung bei <i>Candida</i> -Infektionen.....	64
III.1.2.1. Expressionsmuster der <i>SAP</i> -Gene während oberflächlicher Infektionen von <i>C. albicans</i>	65
III.1.2.2. Expressionsdynamik der <i>SAP</i> -Gene bei systemischen	

Mykosen.....	67
III.1.3. Die Expression der <i>SAP</i> -Gene wird <i>in vivo</i> von den Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p beeinflusst.....	70
III.2. Herstellung einer <i>SAP6</i> -Retransformante.....	72
III.3. Die Aspartat Proteasen Sap9p und Sap10p unterscheiden sich strukturell von den anderen Mitglieder der Sap-Isoenzymfamilie.....	76
III.3.1. Computergestützte Untersuchungen deuten auf eine Zellwandlokalisierung von Sap9p und Sap10p hin.....	76
III.3.2. Die Expression von <i>SAP9</i> - und <i>SAP10</i> -Genen wird unterschiedlich reguliert.....	82
III.3.3. <i>SAP9</i> - und <i>SAP10</i> -ähnliche Gene sind in den Genomen anderer, auch nicht proteolytischer, <i>Candida</i> -Arten.....	84
III.3.4. Gezielte Zerstörung der <i>SAP9</i> - und <i>SAP10</i> -Genlozies.....	87
III.3.5. Phänotypische Untersuchungen der $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Mutanten.....	94
III.4. Untersuchung der proteolytischen Eigenschaften von Sap9p und Sap10p.....	103
III.4.1. Expression von <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> in <i>P. pastoris</i>	103
III.4.2. Aktivitätsbestimmung von Sap9p und Sap10p.....	104
III.4.3. Bestimmung der Substratspezifität von Sap9p und Sap10p.....	105
IV. DISKUSSION.....	108-132
IV. 1. Sekretorische Aspartat-Proteasen als Pathogenitätsfaktor.....	109
IV.1.1. Definition der Virulenzdeterminanten.....	109
IV.1.2. Putative Funktion der Sap-Proteasen.....	109
IV.1.2.1. Sap1p-Sap8p.....	109
IV.1.2.2. Besonderheiten der letzten zwei Mitglieder Sap9p und Sap10p der Sap-Isoenzymfamilie.....	112
IV.1.3. <i>in vitro</i> Expressionsprofil der <i>SAP</i> -Gene.....	116
IV.1.3.1. Expression von <i>SAP1-SAP8 in vitro</i>	116
IV.1.3.2. Expression von <i>SAP9</i> und <i>SAP10 in vitro</i>	120
IV.1.4. Expression von <i>SAP</i> -Genen <i>in vivo</i> und deren	

Bedeutung bei <i>Candida</i> -Infektionen.....	122
IV.1.4.1. Nachweismethoden der Genexpression <i>in vivo</i>	122
IV.1.4.2. Expressionsprofil von <i>SAP1-SAP8 in vivo</i>	123
IV.1.4.3. Expressionsprofil von <i>SAP9</i> und <i>SAP10 in vivo</i>	130
IV.2. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	128
V. LITERATURVERZEICHNIS.....	133
VI. ANHANG.....	153
Abkürzungen.....	154
Danksagungen.....	157
Lebenslauf.....	159