

Molekularbiologische Untersuchungen zur Invasivität von *Candida albicans*.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sascha Thewes

aus Münster

Berlin, im März 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Hube

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 01. Juni 2007

Bescheinigung

gem. § 5 Abs. 4 und Abs. 2b der Promotionsordnung des
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Molekularbiologische Untersuchungen zur Invasivität von *Candida albicans*“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Danksagungen:

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Hube für die Überlassung des spannenden Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Seine Tür stand für Anregungen und Diskussionen jederzeit offen und er ermöglichte die Teilnahme an Konferenzen und auch das Erlernen neuer Methoden. Dafür danke!

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Robert Koch-Institut, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Europäischen Union möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Kollegen aus dem RKI, die Geräte bereitgestellt oder Einweisungen gegeben haben. Insbesondere möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Petra Dersch und Dr. Antje Flieger sowie bei der Gruppe von Prof. Dr. Kroczek für technische Unterstützungen bedanken. Vor allem Ulla, Julia, Martin und Hans-Werner haben mich in vielen Punkten unterstützt. Nicht zu vergessen seien hier noch die Kollegen der Mykologie, bei denen ich immer nach Medien oder Rat fragen konnte.

Ich möchte mich bei Hilde, Michael, Christian Große-Siestrup und allen weiteren Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtungen des Virchow-Krankenhauses für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Marianne Kretschmar und Thomas Nichterlien möchte ich für die hervorragenden Organproben danken. Weiterhin gilt mein Dank Hyunsook Park und Scott Filler für die Infektionsversuche mit meiner Mutante sowie Martin Schaller für die histologischen Aufnahmen.

Florian Wagner danke ich für die Unterstützung bei den Microarray-Anfängen.

Aaron Mitchell möchte ich für die Überlassung der $\Delta rim101$ Mutante danken.

Ein ganz, ganz großes Dankeschön geht an alle ehemaligen NG4ler, FG16er und Neu-Jenaer, die mir bei allen kleineren und größeren Problemen des Laboralltags zur Seite standen. Antje, Oli, Sascha, Ricardo, Rebekka, Donika, Markus, Chantal, Wiebke, Abi, Matze, Yannick, Lydia, Betty, Katherina, Sabine, Gary, Julian, Stefan, Mirco, Duncan, Angelika, Fred: danke!

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern, meinen Geschwistern, Verwandten und Freunden bedanken, die mich von klein auf begleitet und unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Frau Ines bedanken, die immer für mich da war und auch Verständnis mitbrachte, wenn es mal wieder länger im Labor dauerte.

Inhaltsverzeichnis:

Danksagungen	5
Inhaltsverzeichnis	7
1. Einleitung	13
1.1 Pathogene Pilze	13
1.2 Der humanpathogene Pilz <i>Candida albicans</i>	15
1.2.1 Epidemiologie von <i>Candida</i> -Infektionen	15
1.2.2 Prädisponierende Faktoren einer <i>Candida</i> -Infektion	16
1.2.3 Der Infektionsprozess und das Infektionsspektrum einer invasiven <i>C. albicans</i> -Infektion	17
1.2.3.1 Der Weg in das Blut	18
1.2.3.2 Der Weg aus dem Blut heraus	20
1.2.3.3 Das Infektionsspektrum von <i>C. albicans</i>	21
1.2.4 Infektionen der Leber	22
1.2.5 Infektionsmodelle	24
1.3 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>	25
1.3.1 Adhäsion	25
1.3.2 Sekretorische hydrolytische Enzyme	26
1.3.3 Morphogenese und Invasion	28
1.3.4 Metabolismus, Stress und pH	29
1.4 Stammspezifische Unterschiede in der Virulenz von <i>C. albicans</i>	32
1.4.1 Populationsgenetik und stammspezifische Eigenschaften von <i>C. albicans</i>	32
1.4.2 Die <i>C. albicans</i> Stämme SC5314 und ATCC10231 im direkten Vergleich und im Vergleich zu anderen Stämmen	33
1.5 Zielsetzung der Arbeit	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien	37
2.2 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide	38
2.3 Chemikalien	42
2.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	43

2.5 Medien.....	45
2.6 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	46
2.6.1 Lagerung von Mikroorganismen.....	46
2.6.2 Anzucht von <i>E. coli</i>	46
2.6.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für Transformationen.....	47
2.6.4 Anzucht von <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	47
2.7 Phänotypische Untersuchungen von <i>C. albicans</i> -Stämmen.....	47
2.7.1 Wachstumstests (Tropftests) und Agarinvasion.....	48
2.7.2 Toleranz gegenüber oxidativem Stress.....	48
2.7.3 Bestimmung der Ammonium-Aufnahme.....	48
2.7.4 Bestimmung der Hyphenlänge.....	49
2.8 Infektionsmodelle und Probennahme.....	49
2.8.1 Intraperitoneale Infektion der Maus.....	49
2.8.2 <i>Ex vivo</i> hämoperfundierte Leber.....	50
2.8.2.1 <i>Leberentnahme und Perfusion</i>	50
2.8.2.2 <i>Infektion mit C. albicans und Probennahme</i>	51
2.8.3 Intravenöse Infektion der Maus.....	52
2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	52
2.9.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	52
2.9.1.1 <i>Plasmid-Isolation aus E. coli</i>	52
2.9.1.2 <i>Isolierung von genomischer DNA aus C. albicans</i>	53
2.9.1.3 <i>Isolierung von totaler RNA aus C. albicans</i>	54
2.9.1.4 <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	55
2.9.1.5 <i>Qualitätskontrolle von RNA</i>	55
2.9.2 Restriktion und Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	55
2.9.2.1 <i>Restriktion von DNA</i>	55
2.9.2.2 <i>DNA-Gelelektrophorese</i>	55
2.9.2.3 <i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	56
2.9.2.4 <i>RNA-Gelelektrophorese</i>	56
2.9.3 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen.....	56
2.9.3.1 <i>Transfer von DNA auf Membranen</i>	56
2.9.3.2 <i>Transfer von RNA auf Membranen</i>	57
2.9.4 Hybridisierungen.....	57
2.9.4.1 <i>Nicht-radioaktive Markierung von DNA</i>	57

2.9.4.2 DNA-DNA-Hybridisierungen (Southern Blot).....	58
2.9.4.3 RNA-DNA-Hybridisierungen (Northern Blot).....	58
2.9.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	59
2.9.6 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR).....	59
2.9.6.1 Quantitative RT-PCR.....	60
2.9.7 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	60
2.9.8 DNA-Sequenzierung.....	60
2.9.9 Transformation von <i>E. coli</i>	61
2.9.10 Transformation von <i>C. albicans</i>	61
2.9.11 FOA-Behandlung.....	62
2.10 Microarray-Analysen.....	63
2.10.1 Microarrays.....	63
2.10.2 Vergleichende Genomhybridisierung.....	63
2.10.2.1 Markierung von genomischer DNA mit Cy-Farbstoffen.....	63
2.10.2.2 Hybridisierung.....	64
2.10.2.3 Auswertung der Hybridisierung.....	64
2.10.3 Vergleichende Transkriptomanalysen.....	65
2.10.3.1 Ermittlung des Wirt-Pathogen RNA-Verhältnisses.....	65
2.10.3.2 Amplifikation und Markierung von totaler RNA.....	65
2.10.3.3 Hybridisierung.....	66
2.10.3.4 Auswertung der Hybridisierung.....	66
2.10.3.5 Rehybridisierung von Microarrays.....	67
2.10.4 <i>In vitro</i> Transkriptomanalysen.....	67
2.10.4.1 Synthese und Markierung von cDNA.....	67
2.10.4.2 Hybridisierung und Auswertung.....	68
2.10.4.3 Transkriptionsanalyse der Δ dfg16 Mutante.....	68
2.11 Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen.....	69
2.11.1 Blut-Pathogen-Interaktion.....	69
2.11.2 Matrigel-Invasions-Assay.....	69
2.11.3 Arbeiten mit Zellkulturen.....	69
2.11.4 Adhäsionsassay.....	70
2.11.5 Interaktion mit Makrophagen.....	70
2.11.6 Bestimmung der Endocytose-/Invasionsrate von	

<i>C. albicans</i>	71
2.11.7 Infektion von rekonstituiertem humanen Epithel (RHE).....	72
2.12 Mikroskopie.....	72
2.12.1 Lichtmikroskopie.....	72
2.12.2 Immunoelektronenmikroskopie.....	73
2.13 <i>In silico</i> Analysen.....	73
2.14 Statistische Analysen.....	74
3. Ergebnisse	75
3.1 Phänotypische Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231.....	75
3.1.1 Wachstum und Tropftests.....	75
3.1.2 Wachstum in SD-Medium: Transkriptionsprofil und N-Quellen.....	78
3.1.3 Adhäsion an Wirtszellen.....	82
3.1.4 Interaktion mit Makrophagen.....	82
3.1.5 Interaktion mit Blut und Blutkomponenten.....	83
3.1.6 Invasion in Matrigel.....	84
3.1.7 Infektion von rekonstituiertem humanen Epithel (RHE).....	85
3.2 Genotypische Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231.....	86
3.2.1 Paarungstyp von SC5314 und ATCC10231.....	87
3.2.2 Intronanalyse der 25S rDNA.....	88
3.2.3 Vergleichende Genomhybridisierungen.....	89
3.2.4 Vergleich mit Patientenisolaten.....	91
3.3 Die intraperitoneale Infektion der Maus.....	93
3.4 Die <i>ex vivo</i> perfundierte Leber als neues Infektionsmodell.....	94
3.4.1 Der Aufbau.....	94
3.4.2 Etablierung des Systems und Infektion mit <i>C. albicans</i>	95
3.4.2.1 Perfusionsparameter.....	95
3.4.2.2 Histologie des Infektionsverlaufs.....	97
3.5 <i>In vivo</i> und <i>ex vivo</i> Transkriptionsprofile.....	99
3.5.1 <i>In vivo</i> Transkriptionsprofile.....	100
3.5.1.1 Horizontale <i>in vivo</i> Analyse des Stamms SC5314.....	103
3.5.1.2 Horizontale <i>in vivo</i> Analyse des Stamms ATCC10231.....	108
3.5.1.3 Vertikale Analyse der Transkriptionsprofile von	

SC5314 und ATCC10231 in vivo.....	111
3.5.1.4 Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR.....	112
3.5.2 Ex vivo Transkriptionsprofile.....	114
3.5.2.1 Vergleich der Transkriptionsprofile in vivo und ex vivo durch hierarchisches Clustern.....	114
3.5.2.2 Horizontale Analyse der ex vivo Transkriptions- profile von SC5314.....	116
3.5.3 Vergleich der invasiven Zeitpunkte in vivo und ex vivo.....	118
3.6 Charakterisierung der Invasions-assoziierten Gene AXL1 und DFG16.....	120
3.6.1 Charakterisierung von AXL1.....	120
3.6.1.1 Herstellung einer Disruptionskassette und Deletion von AXL1.....	121
3.6.1.2 Phänotypische Charakterisierung von $\Delta axl1$	123
3.6.2 Charakterisierung von DFG16.....	125
3.6.2.1 Genstruktur und Homologie zu anderen Proteinen.....	126
3.6.2.2 Vergleich der DFG16-Sequenzen aus SC5314 und ATCC10231.....	129
3.6.2.3 Herstellung einer Disruptionskassette und Deletion von DFG16.....	130
3.6.2.4 Herstellung von Retransformanten von $\Delta dfg16$	132
3.6.2.5 Phänotypische Charakterisierung von $\Delta dfg16$	132
3.6.2.6 Lokalisation von Dfg16.....	136
3.6.2.7 Transkriptionsprofil von $\Delta dfg16$ unter alkalischen Bedingungen.....	138
3.6.2.8 Interaktion von $\Delta dfg16$ mit humanen Zellen.....	142
3.6.2.9 Orale und systemische Infektion mit $\Delta dfg16$	144
4. Diskussion.....	149
4.1 Die <i>C. albicans</i> Stämme SC5314 und ATCC10231 zeigen nur geringe phänotypische und genotypische Unterschiede.....	149
4.1.1 Phänotypische Unterschiede.....	149

4.1.2 Genotypische Unterschiede.....	153
4.2 Die <i>ex vivo</i> perfundierte Leber als neues Infektionsmodell.....	156
4.2.1 Aufbau des Modells und allgemeine Perfusionsparameter.....	157
4.2.2 Stamm ATCC10231 ist auf der perfundierten Leber nicht-invasiv.....	158
4.3 Die <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Transkriptionsprofile sind phasen- und stammspezifisch.....	159
4.3.1 Experimentelles Design.....	159
4.3.2 Phasen- und stammspezifische Genexpression.....	160
4.3.3 Die Transkriptionsprofile reflektieren metabolische und morphologische Eigenschaften von <i>C. albicans</i> während der Infektion.....	161
4.3.3.1 <i>Metabolismus, Stress und Nährstoffe</i>	161
4.3.3.2 <i>Adhäsion und Hyphen</i>	163
4.3.4 Die Rolle des pH-Werts während einer Infektion.....	164
4.3.4.1 <i>Der pH-Wert und die Eisenaufnahme</i>	165
4.3.4.2 <i>Der pH-Wert und die Phosphataufnahme</i>	165
4.3.5 Vergleich der Lebertranskriptionsprofile mit den Profilen anderer Infektionsmodelle.....	167
4.4 Die putative Metalloproteinase Axl1 hat keinen Einfluss auf die Invasion.....	169
4.5 <i>DFG16</i> kodiert für einen putativen Membransensor des Rim101- Signaltransduktionswegs.....	170
4.6 Gibt es Invasionsgene in <i>C. albicans</i> ?.....	174
4.7 Ausblick.....	175
5. Zusammenfassung / Summary.....	177
6. Literaturverzeichnis.....	181
Verzeichnis der erfolgten Publikationen.....	205
Lebenslauf.....	206
Anhang.....	207