

**Funktion und Regulation sekretorischer und
zellwandassoziierter Proteasen von *Candida albicans***

Inauguraldissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Antje Albrecht
aus Berlin**

Berlin, Juni 2006

1. Gutachter: PD Dr. Bernhard Hube

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Datum der Disputation: 11. September 2006

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Nutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um das Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Berlin, den 27. Juni 2006

Antje Albrecht

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	9
Summary	11
I. Einleitung	13
I.1. Die historische Entdeckung und Beschreibung humanpathogener Pilze der Gattung <i>Candida</i>	13
I.2. <i>Candida</i> Spezies und deren Bedeutung als Pathogen.....	14
I.3. Eigenschaften von <i>Candida albicans</i>	16
I.3.1. Aufbau der Zellwand von <i>Candida albicans</i>	17
I.3.2. Virulenzfaktoren von <i>Candida albicans</i>	18
I.3.2.1. Dimorphismus	19
I.3.2.2. Adhäsion	21
I.3.2.3. Biofilmformation.....	23
I.3.2.4. Phänotypisches Switching.....	23
I.3.2.5. Sekretorische hydrolytische Enzyme.....	24
I.3.2.6. Weitere virulenzassoziierte Faktoren	26
I.4. Sekretorische Aspartatproteasen von <i>Candida albicans</i>	27
I.4.1. Struktur und Prozessierung der sekretorischen Aspartatproteasen	28
I.4.1.1. Strukturelle Ähnlichkeiten der Aspartatproteasefamilien aus <i>Candida albicans</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
I.4.2. Biochemische Eigenschaften der sekretorischen Aspartatproteasen.....	30
I.4.3. Humane Substrate der sekretorischen Aspartatproteasen	31
I.4.4. Bedeutung der sekretorischen Aspartatproteasen als Virulenzfaktor	32
I.4.4.1. Sekretorische Aspartatproteasen und deren Zusammenspiel mit anderen Virulenzfaktoren	33
I.4.5. Expression der sekretorischen Aspartatproteasen <i>in vitro</i>	34

I.4.6.	Expression der sekretorischen Aspartatproteasen in Infektionsmodellen	36
I.4.7.	Expression der sekretorischen Aspartatproteasen <i>in vivo</i>	37
I.5.	Ziel der Arbeit.....	38
II.	Material und Methoden	40
II.1.	Organismen	40
II.1.1.	Pilzstämme	40
II.1.2.	Bakterienstämme	44
II.2.	Plasmide und Primer	45
II.2.1.	Plasmide	45
II.2.2.	Primer	47
II.3.	Chemikalien	51
II.3.1.	Pufferlösungen.....	52
II.3.1.1.	Citratpuffer	52
II.3.1.2.	Phosphatpuffer.....	53
II.3.2.	Kulturmedien.....	53
II.4.	Methoden	57
II.4.1.	Lagerung von Mikroorganismen	57
II.4.2.	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	57
II.4.2.1.	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen für die Transformation.....	58
II.4.3.	Anzucht von <i>Pichia pastoris</i>	59
II.4.4.	Anzucht von <i>Candida albicans</i>	60
II.4.5.	RHE Infektion mit <i>Candida</i>	60
II.4.6.	<i>Candida</i> Adhäsionsassay	61
II.4.7.	Tierversuche	62
II.4.8.	Arbeiten mit RNA	63

II.4.8.1.	RNA Isolierung	63
II.4.8.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	64
II.4.8.3.	Gelelektrophorese der RNA	65
II.4.9.	Arbeiten mit cDNA	65
II.4.9.1.	RT PCR	66
II.4.9.2.	Real Time TaqMan™ PCR Technologie	67
II.4.9.3.	Mikroarrayanalysen	68
II.4.10.	Arbeiten mit DNA.....	71
II.4.10.1.	Isolierung von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	71
II.4.10.2.	Isolierung genomischer DNA aus <i>Candida albicans</i>	72
II.4.10.3.	Phenol / Chloroform Extraktion der DNA.....	73
II.4.10.4.	Fällung der DNA aus Lösungen	73
II.4.10.5.	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsenzyme.....	74
II.4.10.6.	Agarosegelelektrophorese	74
II.4.10.7.	Eluierung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel.....	75
II.4.10.8.	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	75
II.4.10.9.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	75
II.4.10.10.	DNA Sequenzierungen	76
II.4.10.11.	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren.....	77
II.4.10.12.	Behandlung linearisierter Vektoren mit dem Klenow Fragment.....	78
II.4.10.13.	Ligation	78
II.4.10.14.	Transformation in <i>Escherichia coli</i>	78
II.4.10.15.	Transformation in <i>Candida albicans</i>	79
II.4.10.16.	FOA Behandlung	82
II.4.10.17.	Southern Blot	82
II.4.11.	Arbeiten mit Proteinen	85
II.4.11.1.	Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der SDS PAGE	85
II.4.11.2.	Färbungen der Proteingele	86
II.4.11.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	87
II.4.11.4.	Substrat – und pH – Spezifität der Proteasen	88
II.4.12.	Datenbanken und <i>in silico</i> Datenverarbeitung	88
II.4.13.	Mikroskopische Untersuchungen.....	89
III.	Ergebnisse	90
III.1.	Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Expression der sekretorischen Aspartatproteasen	90
III.1.1.	<i>In silico</i> Analyse der <i>SAP</i> Promotorsequenzen	90
III.1.1.1.	Putative Transkriptionsfaktoren der <i>SAP</i> Gene.....	91
III.1.2.	<i>In vitro</i> Analyse der Transkriptionsregulation der <i>SAP</i> Gene.....	97
III.1.2.1.	<i>SAP</i> Genexpression in Transkriptionsfaktormutanten.....	97

III.1.3.	<i>In vivo</i> Analyse der Transkriptionsregulation der Gene <i>SAP4</i> bis <i>SAP6</i>	100
III.1.3.1.	Efg1 ist Transkriptionsaktivator der Gene <i>SAP4</i> bis <i>SAP6</i> .	100
III.2.	<i>In silico</i> Analyse der beiden Aspartatproteasen <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i>	101
III.2.1.	Genomische Lokalisation der Proteasegene <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i>	102
III.2.2.	Gemeinsamkeiten der Proteasen Sap9 und Sap10 mit den anderen Mitgliedern der Sap Familie	103
III.2.3.	Unterschiede der Proteasen Sap9 und Sap10 zu den anderen Mitgliedern der Sap Familie	104
III.3.	Heterologe Expression der Proteasen Sap9 und Sap10 in <i>Pichia pastoris</i>	107
III.3.1.	Das <i>Pichia pastoris</i> Expressionssystem	107
III.3.2.	Die C- terminalen Enden mit putativen GPI Anker Konsensussequenzen verhindern die Sekretion der Proteasen Sap9 und Sap10	108
III.4.	Lokalisation der Proteasen Sap9 und Sap10.....	109
III.4.1.	Konstruktion von Gfp Fusionsproteinen.....	109
III.4.2.	Sap9 und Sap10 sind unterschiedlich lokalisiert.....	112
III.5.	Größe und Untereinheiten der Proteasen Sap9 und Sap10	113
III.5.1.	Untersuchung des Laufverhaltens der heterolog exprimierten Proteine Sap9 und Sap10 in einer SDS PAGE	113
III.6.	Glykosylierungen der Proteasen Sap9 und Sap10	115
III.6.1.	Potentielle N- Glykosylierungsstellen von Sap9 und Sap10	115
III.6.2.	Nachweis der N- Glykosylierung.....	117
III.7.	Herstellung von Einzel – und Doppelmutanten der Proteasegene <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i>	118
III.7.1.	Konstruktion des <i>SAP10</i> Disruptionsplasmides.....	118
III.7.2.	Generierung der Transformantenstämme	120
III.8.	Herstellung der Retransformantenstämme	123
III.8.1.	Konstruktion der Retransformationsplasmide und – Stämme ...	124

III.9.	Phänotypscreen der Protease – Mutantenstämme.....	126
III.9.1.	Medienauswahl für den Phänotypscreen.....	126
III.9.2.	Sap9 und Sap10 sind für die Integrität der Zelloberfläche von Bedeutung.....	129
III.10.	Zellwandzusammensetzung der $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ Einzelmutanten	134
III.10.1.	Erhöhter Proteingehalt in der Zellwand der $\Delta sap10$ Mutante....	134
III.10.2.	Erhöhter Chitingehalt in der Zellwand der $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ Einzelmutante	135
III.11.	Sprossungsverhalten der Mutanten $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$	136
III.11.1.	Fehlfunktion der Mutanten $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ bei der Trennung von Mutter – und Tochterzelle	136
III.12.	Untersuchungen der Mutanten $\Delta sap9$, $\Delta sap10$ und $\Delta sap9/\Delta sap10$ mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.....	140
III.12.1.	Strukturelle Veränderungen der Zellwand in den Mutanten $\Delta sap9$, $\Delta sap10$ und $\Delta sap9/\Delta sap10$	140
III.13.	Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 während oraler Oberflächeninfektionen	143
III.13.1.	Verringerte Virulenz als Folge der $SAP9$ und $SAP10$ Deletion im RHE Model.....	144
III.14.	Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 während der Adhäsion an humane Epithelzellen.....	147
III.14.1.	Unterschiedliches Adhäsionsverhalten als Folge der $SAP9$ und $SAP10$ Deletion.....	147
III.15.	Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 während systemischer Infektionen.....	150
III.15.1.	Moderate Abschwächung der Virulenz als Folge der $SAP9$ und $SAP10$ Deletion im Tiermodel	150
III.16.	Substrat – und pH – Spezifität der beiden Proteasen Sap9 und Sap10.....	152
III.16.1.	Humane Proteine und Bovine Serum Albumin gehören nicht zu den Substraten von Sap9 und Sap10.....	153

III.16.2.	Substratspezifität von Sap9 und Sap10 ähnelt der von Yapsinen aus <i>S. cerevisiae</i>	156
III.17.	Überexpressionen von <i>SAP9</i> in der Δ <i>kex2</i> und Δ <i>sap10</i> Mutante sowie von <i>SAP10</i> in der Δ <i>kex2</i> und Δ <i>sap9</i> Mutante	158
III.17.1.	Konstruktion der Überexpressionsstämme	159
III.17.2.	Funktionelle Überlappung der Proteasen Sap9, Sap10 und Kex2.....	161
III.17.2.1.	Überlappende Funktionen von Sap9 und Sap10 mit der Protease Kex2	161
III.17.2.2.	Überlappende Funktion der Proteasen Sap9 und Sap10 untereinander.....	162
III.18.	Überexpressionen von <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> im Wildtyp	163
III.18.1.	Konstruktion der Überexpressionstämme.....	164
III.18.2.	Resistenzentwicklung gegenüber Zelloberflächen – angreifenden Substanzen in Folge der <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> Überexpression.....	164
III.19.	Expression von <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> im Wildtyp in Abhängigkeit des Anzuchtmediums.....	166
III.19.1.	Quantitative Bestimmung der <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> Expression	166
III.19.1.1.	Signifikante Expressionssteigerung von <i>SAP9</i>	167
III.19.1.2.	Unbeständige Expression von <i>SAP10</i>	168
III.20.	Expression von <i>SAP9</i> in den Mutanten Δ <i>kex2</i> und Δ <i>sap10</i> sowie von <i>SAP10</i> in den Mutanten Δ <i>kex2</i> und Δ <i>sap9</i>	170
III.20.1.	Erhöhte Transkription der Gene <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> in den Δ <i>kex2</i> , Δ <i>sap9</i> und Δ <i>sap10</i> Mutanten	170
III.20.2.	Bestätigung der Mikroarray Ergebnisse mit Hilfe der Real Time TaqMan TM PCR.....	172
III.21.	Vergleich der Transkriptionsprofile der Mutanten Δ <i>sap9</i> und Δ <i>sap10</i> mit dem des Wildtyps	173
III.21.1.	Unterschiedliche Transkriptionsprofile der Δ <i>sap9</i> und Δ <i>sap10</i> Mutante	173
III.21.2.	Erhöhte Expression einiger identischer Gene in der Δ <i>sap9</i> und der Δ <i>sap10</i> Mutante	178
III.22.	Mögliche weitere Mitglieder der <i>SAP</i> Familie.....	179

III.22.1.	<i>In silico</i> Analyse des <i>Candida albicans</i> Genoms	180
III.22.2.	<i>IPF14031</i> als putatives Mitglied der <i>SAP</i> Familie	181
IV.	Diskussion	185
IV.1.	Putative Bindestellen von Transkriptionsfaktoren und deren Einfluss auf die Expression der <i>SAP</i> Gene von <i>Candida albicans</i>	185
IV.1.1.	Putative Bindestellen von Transkriptionsfaktoren innerhalb der Promotorregionen der <i>SAP</i> Gene	185
IV.1.2.	Die Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1 beeinflussen die Expression der Gene <i>SAP4</i> bis <i>SAP6</i> <i>in vitro</i>	188
IV.1.3.	Der Transkriptionsfaktor Efg1 fungiert als Aktivator der <i>SAP4</i> bis <i>SAP6</i> Genexpression <i>in vivo</i>	190
IV.2.	Die Proteasen Sap9 und Sap10 aus <i>Candida albicans</i>	190
IV.2.1.	Sap9 und Sap10 unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der Sap Familie durch eine GPI Verankerung	190
IV.2.2.	Die N- Glykosylierung von Sap9 und Sap10 weicht von anderen Sap Proteinen ab	192
IV.2.3.	Sap9 besteht aus mehreren Untereinheiten und ist zur Selbstprozessierung befähigt	193
IV.2.4.	Anmerkungen zur Erzeugung von Mutanten mit der Ura – Blaster Methode	195
IV.2.5.	Die Proteasen Sap9 und Sap10 sind für die Integrität der Zelloberfläche von maßgeblicher Bedeutung	196
IV.2.6.	Die Deletion der Gene <i>SAP9</i> und <i>SAP10</i> bewirkt eine Änderung der Zellwandzusammensetzung	200
IV.2.7.	Die fehlende Aktivität der Proteasen Sap9 und Sap10 führt während der Sprossung zu einer Fehlfunktion der Trennung von Mutter – und Tochterzelle	201
IV.2.8.	Mutantenstämme denen die Gene <i>SAP9</i> und <i>Sap10</i> fehlen, weisen eine abgeschwächte Virulenz und ein geändertes Adhäsionsverhalten auf	202
IV.2.9.	Mögliche Substrate der Proteasen Sap9 und Sap10	205

IV.2.9.1.	Das Prozessierungsmuster von Sap9 und Sap10 ähnelt dem der Protease Kex2 und der Yapsine aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	207
IV.3.	Weitere Mitglieder der Sap Familie in <i>Candida albicans</i> und homologe Proteine in verwandten Organismen	210
IV.4.	Weiterführende Arbeiten	213
V.	Literaturverzeichnis	215
VI.	Veröffentlichungen	230
VII.	Abkürzungsverzeichnis	231
	Danksagung	233