

3. Ergebnisse

3.1 Interaktionen von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe

Candida albicans besiedelt als Bestandteil der mikrobiellen Flora Haut und Schleimhäute des Menschen. Kommt es zu Störungen dieses empfindlichen Gleichgewichtes, kann die natürliche in eine maligne Interaktion umschlagen, und es kommt zu einer unkontrollierten Vermehrung des Pilzes. Im Folgenden wurde die Interaktion von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe untersucht, wofür zum einen ein *in vitro* generiertes orales Epithelgewebe (RHE) und zum anderen eine orale Epithelzelllinie (TR146) verwendet wurde.

3.1.1 Interaktionen mit oralem Epithelgewebe (RHE)

Um die Interaktion von *C. albicans* SC5314 (Wildtyp, WT) mit dem Epithelgewebe zu untersuchen, wurde dieses mit *C. albicans* infiziert und mikroskopisch analysiert. Abbildung 1 zeigt rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der frühen Interaktion (1 h) von *C. albicans* mit dem oralen Epithelgewebe. Die Pilzzellen waren zu diesem Zeitpunkt vornehmlich auf der Oberfläche des Gewebes lokalisiert. Der initiale Kontakt zwischen Pilzzellen und Epithelzellen stimulierte einen unmittelbaren Wechsel zu der elongierten Hyphenform; 1 h nach Infektionsbeginn („post infektion“, p.i.) lagen >98% der Zellen in der Hyphenmorphologie vor. Einhergehend mit dem Hefe/Myzel Übergang fand auch die Adhäsion an das Gewebe statt. Die Adhäsion wird zum einen unterstützt durch bekannte Adhäsionsfaktoren (Sundstrom, 2002) und zum anderen durch, von den Pilzzellen stimulierte, sichtbare Änderungen der epithelialen Oberfläche (Abbildung 1). Pseudopodienartige Strukturen der Epithelzellen umschlossen (Abbildung 1, A, C, D und I) oder bedeckten (Abbildung 1, B und E) die elongierten Hyphen. Auffällige Membranstrukturen wie in Abbildung 1, C und D, stellten deutliche Zeichen für eine induzierte Endozytose dar (Park *et al.*, 2005).

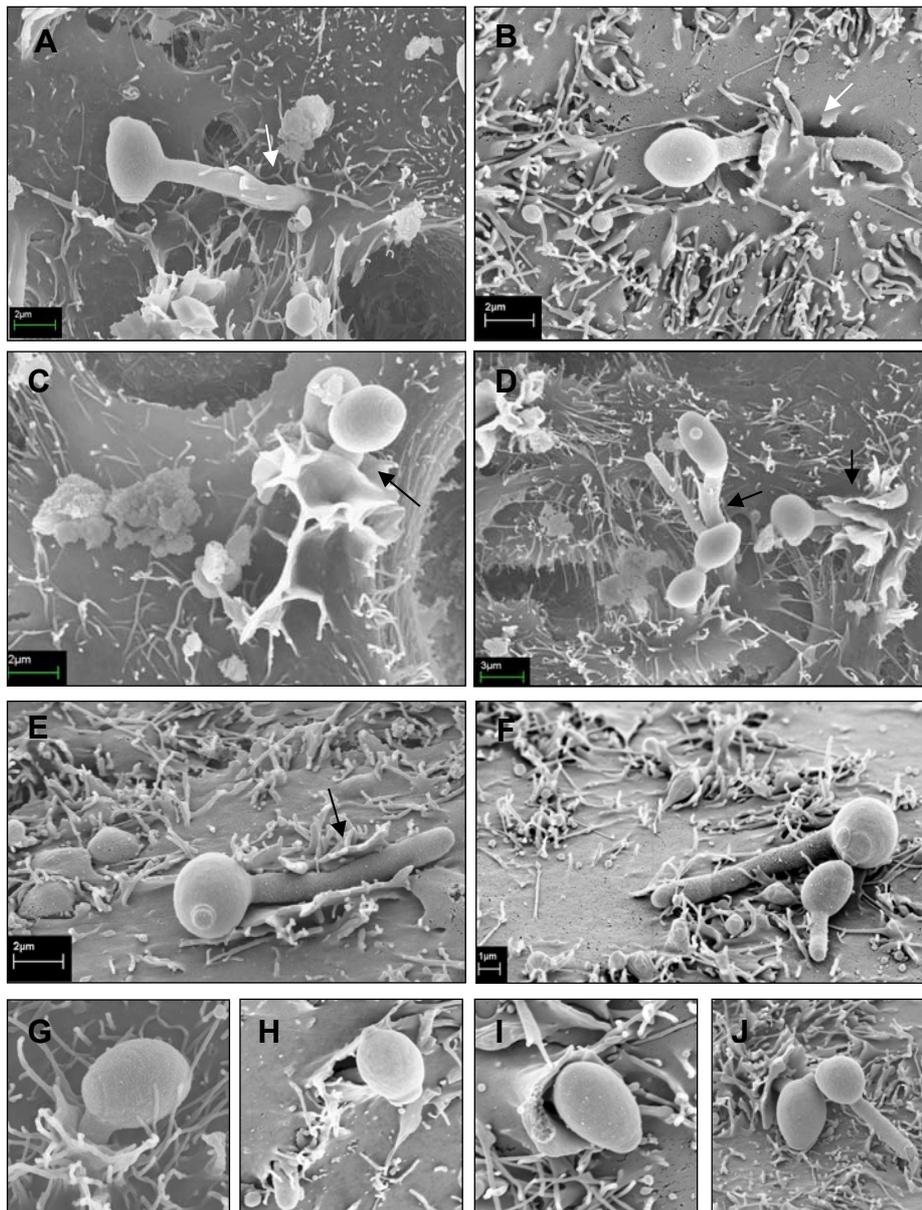


Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der experimentellen RHE-Infektion (1 h)

Auf den Abbildungen A-J ist die Interaktion der *C. albicans* Zellen mit dem oralen Epithelgewebe (RHE) dargestellt (1 h). Deutlich zu sehen sind die pseudopodienartigen Zellfortsätze der Epithelzellen, die mit den Hyphenzellen interagieren und auf diese zuwachsen (Pfeile in A, D) oder diese bedecken (Pfeil in B). Durch die Pilzzellen induzierte Veränderungen der epithelialen Oberfläche (*membrane ruffling*) führen zum Umschließen ganzer Zellen (C, D, G und I) und induzieren so auch ein invasives Eindringen der Pilzzellen in die Epithelzellen.

Nach 24 h experimenteller Infektion war das Gewebe von einem dichten Myzelgeflecht bedeckt (Abbildung 2, A). Wie in Abbildung 2 zu sehen, penetrierten die Hyphen direkt in das Gewebe (Abbildung 2, E und G), wuchsen entlang der Oberfläche (Abbildung 3, I) und im Gewebe (Abbildung 3, C und D, Abbildung 4, A-D). Die Ausbreitung im Gewebe fand ausschließlich in der Hyphenform statt. In Abbildung 3 zeigen transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen die Penetration der Hyphen direkt durch die Epithelzellen. Abbildung 3, A und D zeigen Hyphen bei einer direkten Penetration durch den Zellkern. In den Abbildungen 3, B und C sind Hyphen dargestellt, die von epithelialen Zellausläufern bedeckt bzw. umschlossen werden. Im Gewebe fand die Ausbreitung der Hyphen häufig auch eingebettet in Membranstrukturen statt. Abbildung 4, A und B zeigt diese tunnelartigen Strukturen. Zusätzlich zu den Mechanismen der induzierten Endozytose schien vor allem zu den späteren Zeitpunkten der Interaktion vermehrt auch eine direkte Penetration der Hyphenzellen in das Epithelgewebe stattzufinden. Einhergehend mit der Penetration und Invasion des Gewebes fand eine Zerstörung des Gewebeverbandes und der Zellen statt. Als Maß für die Zerstörung des Gewebes wurde die extrazelluläre Aktivität eines epithelialen Marker-Enzyms bestimmt (Laktat Dehydrogenase, LDH). Bei Zerstörung der Epithelzellen wird dieses Enzym freigesetzt und kann im Medium gemessen und quantifiziert werden. In Abbildung 5 ist die Entwicklung der LDH Aktivität über einen Zeitraum von 24 h dargestellt.

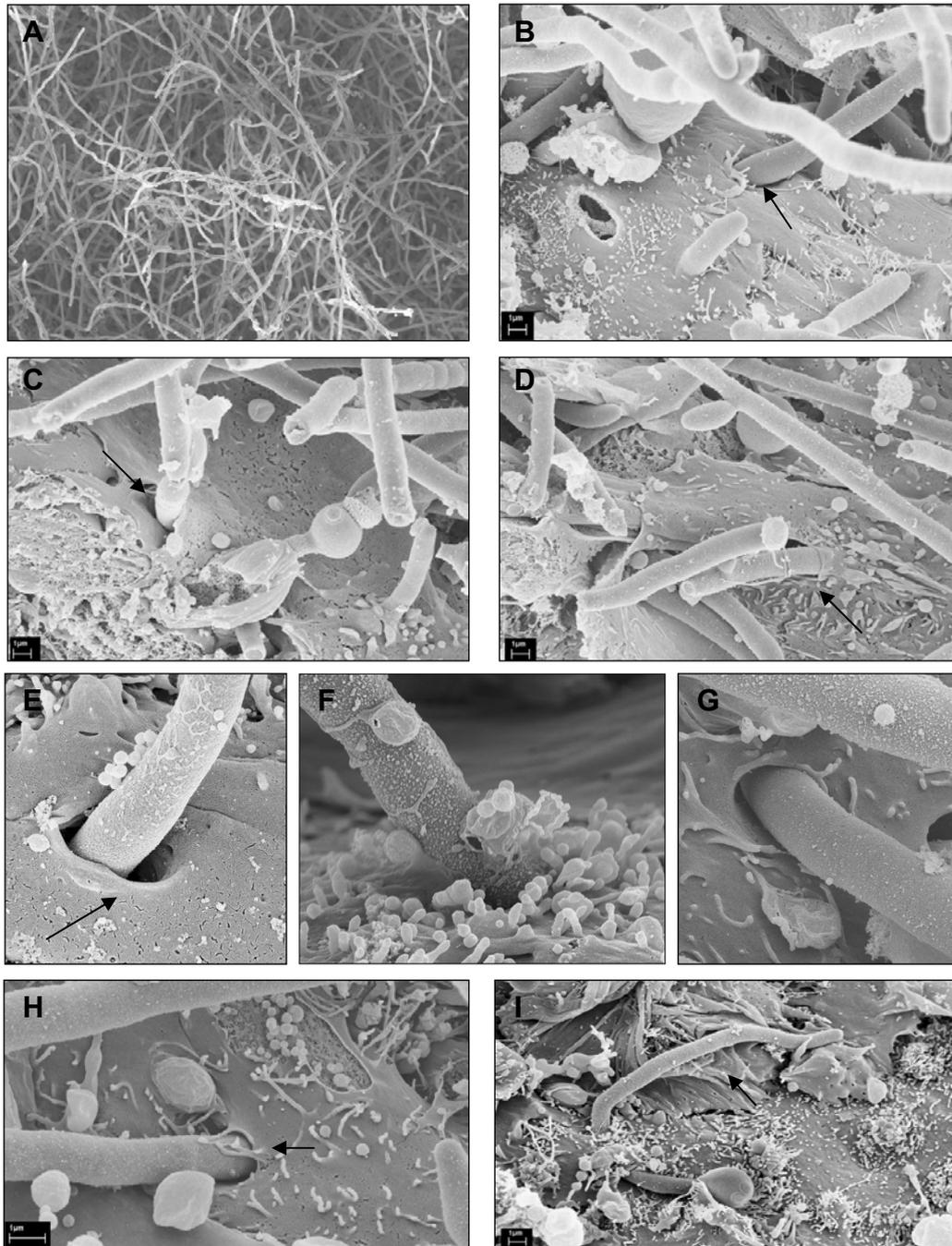


Abbildung 2. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der experimentellen RHE-Infektion (24 h)

Auf den Abbildungen A-I sind die Interaktionen der *C. albicans* Zellen mit dem oralen Epithelgewebe dargestellt (24 h). Zu den späten Zeitpunkten der Interaktion war das Epithelgewebe von einem dichten Myzelgeflecht bedeckt (A). Die elongierten Hyphenzellen penetrierten direkt in das epitheliale Gewebe (Pfeile in B, E-G, I) oder wuchsen entlang der Oberfläche des Gewebes (Pfeil in I).

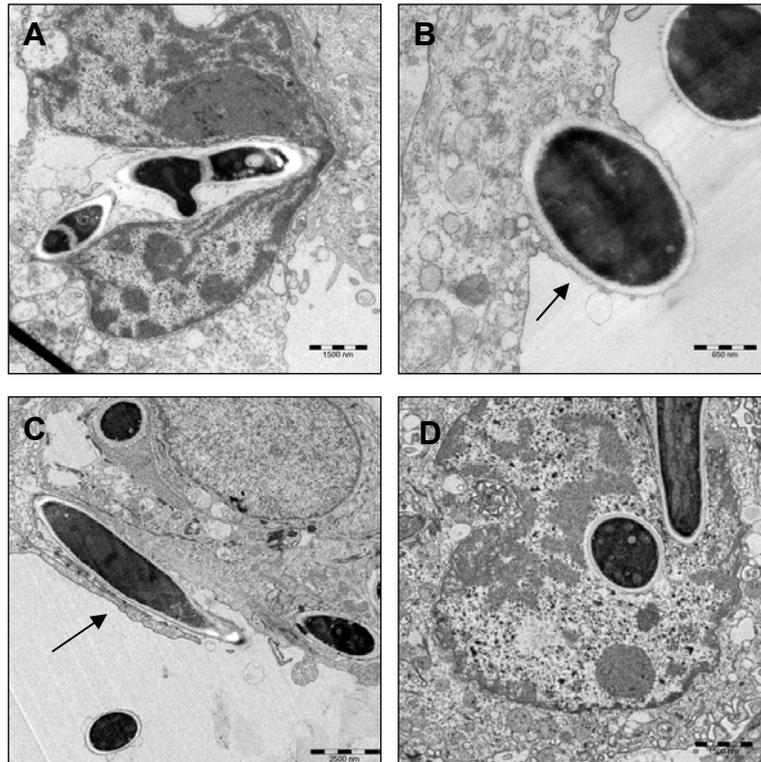


Abbildung 3. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen der experimentellen RHE-Infektion (24 h)

In den Abbildungen sind die Interaktionen der Hyphenzellen mit dem oralen Epithelgewebe dargestellt. Die Penetration der Hyphenzellen im Gewebe erfolgte teilweise direkt durch die einzelnen Epithelzellen (A und D). Einige der Hyphen durchdrangen sogar den Zellkern (A). In den Abbildungen B und C sind Hyphenzellen dargestellt, die von epithelialen Zellausläufern bedeckt sind (Pfeile in B und C). Aufgrund der Tatsache, dass in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ausschließlich Hyphen zu beobachten waren, wurde angenommen, dass es sich bei den kreisförmigen Pilzstrukturen um querschnittene Hyphen handelte.

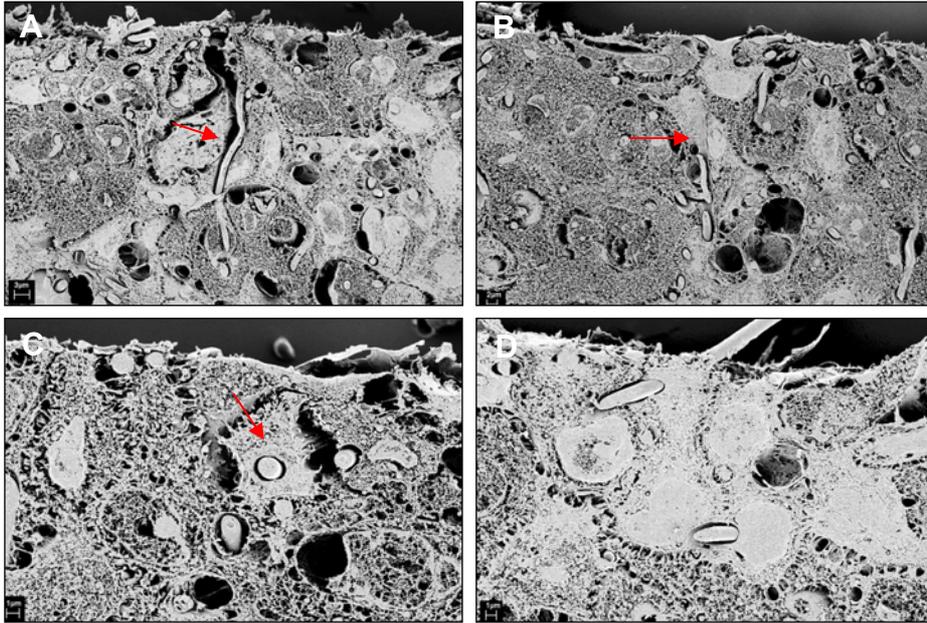


Abbildung 4. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der experimentellen RHE-Infektion (Paraffineinbettung) (24 h)

Die infizierten RHE Proben wurden 24 h p.i. in Paraffin eingebettet und lateral geschnitten. In den Abbildungen ist die Ausbreitung der Hyphenzellen im Gewebe dargestellt. In den Abbildungen C und D ist die Penetration von Hyphenzelle durch Epithelzellen dargestellt. Die Abbildungen A und B zeigen das Wachstum und die Verbreitung der Hyphen in den Gewebestrukturen, teilweise eingebettet in tunnelartige Membranstrukturen (angezeigt durch die Pfeile in den Abbildungen).

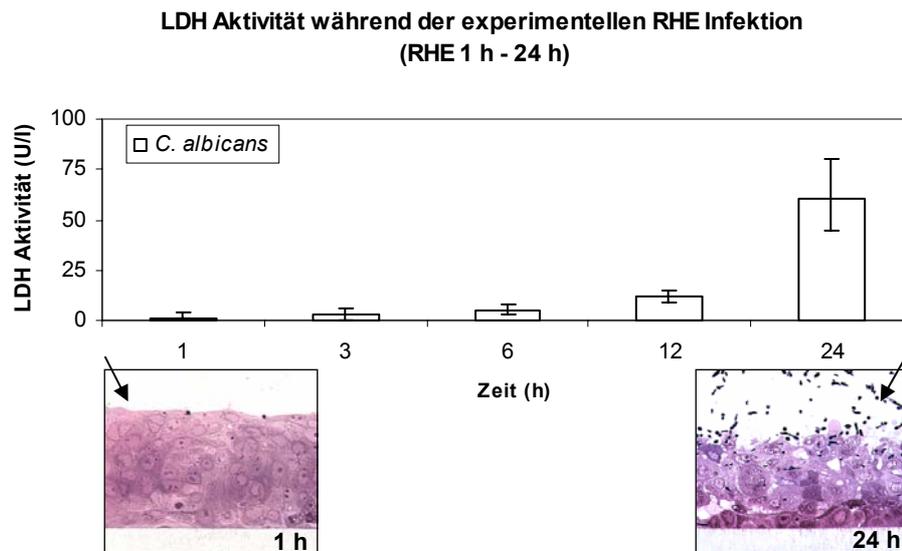


Abbildung 5. Extrazelluläre LDH Aktivität während der RHE Infektion durch *C. albicans*

Das Diagramm gibt die extrazelluläre LDH-Aktivität während der experimentellen Infektion wieder (1-24 h). In den Abbildungen sind histologische Schnitte der RHE Infektion nach 1 h und 24 h dargestellt. Deutlich sichtbar ist die Korrelation zwischen dem zerstörten Gewebe nach 24 h und der Zunahme der gemessenen extrazellulären LDH-Aktivität.

Übereinstimmend mit den mikroskopischen Untersuchungen fand zu den frühen Zeitpunkten der experimentellen Infektion kaum Gewebeerstörung statt. Dies wurde durch eine niedrige extrazelluläre LDH Aktivität angedeutet. Die späteren Zeitpunkte, in denen eine deutliche Penetration und Invasion in das Gewebe beobachtet werden konnte, waren jedoch durch hohe LDH Werte gekennzeichnet. Basierend auf den Analysen der Interaktionen von *C. albicans* mit epitheliale Gewebe, konnte die experimentelle Infektion daher in drei Phasen gegliedert werden, die in Tabelle 1 zusammengefasst dargestellt sind.

Tabelle 1. Zusammenfassung der mikroskopischen Analyse der Interaktion von *C. albicans* mit dem oralen Epithelgewebe (RHE)

	Pathogen (<i>C. albicans</i>)	Wirt (RHE)
Frühe Phase (1 h)	Hypheninduktion Adhäsion	Bildung von Pseudopodien <i>membrane ruffling</i> induzierte Endozytose kaum Gewebsschädigung
Mittlere Phase (3-6 h)	Beginnende Penetration /Invasion Elongation der Hyphen	Leichte Gewebsschädigung
Späte Phase (>12 h)	Invasion des Gewebes Ausbreitung im Gewebe Langes, dicht vernetztes Hyphengeflecht	Starke Gewebsschädigung

Die Analyse der experimentellen Infektion mit dem oralen Epithelgewebe (RHE) zeigte, dass es sich um einen dynamischen Interaktionsprozess handelt, der sich in verschiedene Stadien einteilen lässt. Dabei spielen sowohl Wirtsfaktoren (z.B. Änderung der epithelialen Oberflächenstrukturen, induzierte Endozytose) als auch pilzspezifische Faktoren (Hefe/Myzel Übergang, Adhäsion und aktive Gewebepenetration) eine wichtige Rolle. Im Folgenden sollten einige Aspekte der Interaktion auf zellulärer Ebene weiterführend untersucht werden.

3.1.2 *S. cerevisiae* interagiert nicht mit oralen Epithelgewebe

Bei *S. cerevisiae* handelt es sich um eine primär monomorphe Hefe und einen weit verbreiteten, apathogenen Modelorganismus. Um zu untersuchen, ob die durch *C. albicans* induzierten Änderungen der epithelialen Oberflächenstruktur pathogen- oder generell partikelspezifisch sind, wurde das RHE mit *S. cerevisiae* infiziert und die Interaktion mikroskopisch analysiert. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, führte die Interaktion von *S. cerevisiae* nicht zu Änderungen der epithelialen Oberflächenstrukturen. In den untersuchten Infektions- Zeiträumen (1 h und 24 h)

konnten nur wenige Hefezellen auf der Oberfläche des Gewebes beobachtet werden. Eine Gewebeschädigung wie bei *C. albicans* konnte nicht festgestellt werden.

Die Infektion des oralen Epithelgewebes mit *S. cerevisiae* zeigte deshalb, dass es sich bei den durch *C. albicans* induzierten epithelialen Oberflächenstrukturen durchaus um eine spezifische „Antwort“ auf das Pathogen *C. albicans* handelte und nicht um eine generelle Reaktion auf Fremdpartikel. Eine sehr wichtige Komponente spielte dabei die Induktion der elongierten Hyphenform, da nur diese Morphologie bei *C. albicans* die Aktivierung der Wirtszelle (induzierte Endozytose, Bildung von Pseudopodien) auslöste.

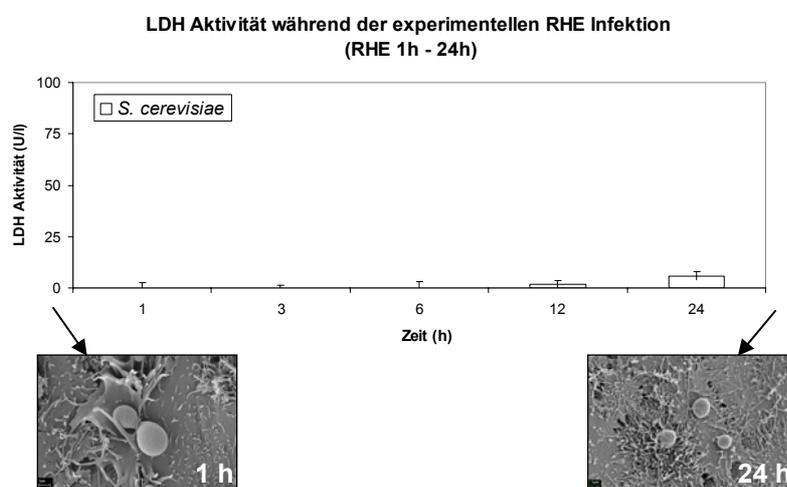


Abbildung 6. Extrazelluläre LDH-Aktivität während der experimentellen RHE Infektion durch *S. cerevisiae*

Das Diagramm gibt die extrazelluläre LDH-Aktivität während der experimentellen Infektion wieder (1-24 h). In den Abbildungen sind REM Aufnahmen der experimentellen RHE Infektion durch *S. cerevisiae* nach 1 h und 24 h dargestellt. Im Vergleich zu einer Infektion mit *C. albicans* fand bei der Infektion mit *S. cerevisiae* kaum Gewebeschädigung statt, angedeutet durch niedrige extrazelluläre LDH-Aktivitäten.

3.1.3 Die Interaktionen von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe sind unabhängig von umgebenden Medien

Um zu untersuchen, ob die Interaktion des Pilzes mit dem Epithelgewebe auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen zurückzuführen ist, wurde *C. albicans* statt in PBS (*phosphate-buffered saline*, pH 7,2) in zwei glukosereichen Medien (YPD und MM) auf dem RHE inkubiert. Die *C. albicans* Zellen wurden dazu, wie im Material und Methodenteil (Abschnitt 2.2.5: RHE Infektion mit *C. albicans*) beschrieben, gewaschen, und die Pilzzellkonzentration für die Infektion des Gewebes wurden nicht in PBS, sondern in den jeweiligen Medien eingestellt. Bei YPD-Medium handelt es sich um ein Vollmedium, bei dem Maintenance-Medium (MM) um ein Zellkulturmedium ohne Serum, welches für die Kultivierung des RHE verwendet wurde. Mit diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob durch die Verfügbarkeit von Glukose und anderen Nährstoffen das Invasions- und Penetrationsverhalten des Pilzes beeinflusst wird.

Die quantifizierte, extrazelluläre LDH-Freisetzung zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Proben. Demnach gab es keinen Unterschied im Invasions- und Penetrationsverhalten und der damit verbundenen Zerstörung des Gewebes. Die Interaktion des Pilzes mit dem Gewebe erfolgt also anscheinend unabhängig vom umgebenden Medium.

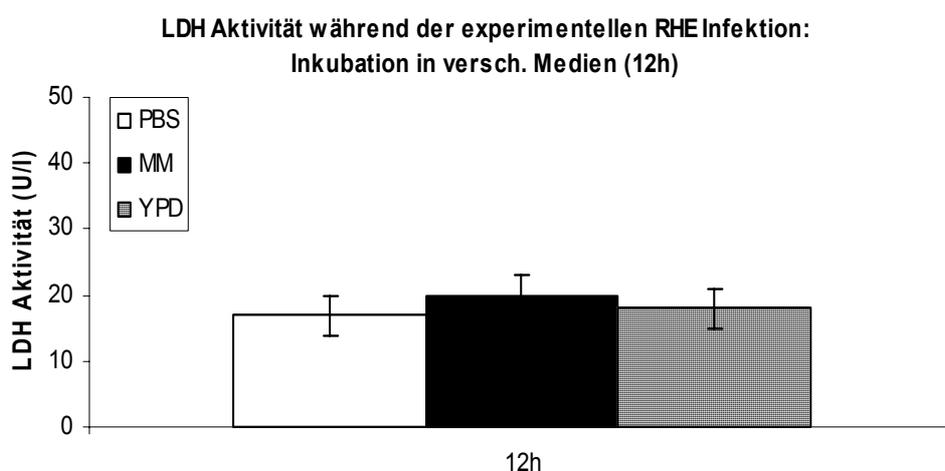


Abbildung 7. Extrazelluläre LDH Aktivität während der experimentellen RHE Infektion mit verschiedenen Medien

Die Verfügbarkeit von Nährstoffen scheint bei der Interaktion mit oralem Epithelgewebe keinen Einfluss auf *C. albicans* Zellen auszuüben.

3.1.4 Speichel bietet dem Epithelgewebe Schutz vor *C. albicans*

Die Rolle von Speichel als Schutz vor der Etablierung einer oralen *C. albicans* Infektion wird kontrovers diskutiert. Die bisher gewonnenen *in vivo* Daten über eine möglicherweise veränderte Speichelzusammensetzung bei HIV⁺ Patienten sind kontrovers und spiegeln kein klares Bild wieder (de Repentigny *et al.*, 2004). Abgesehen von einigen Speichelproteinen, für die eine unterstützende Funktion bei der Adhärenz von *C. albicans* an Epithelzellen gezeigt wurde (Holmes *et al.*, 2002), gilt Speichel aufgrund der antimikrobiellen Komponenten als Schutzbarriere für das Epithel (de Repentigny *et al.*, 2004). Um zu untersuchen ob Speichel einen Einfluss auf die *in vitro* durchgeführte, experimentelle RHE Infektion hat, wurde das Gewebe mit *C. albicans* und Speichel inkubiert. Dazu wurde frischer, unstimulierter Speichel von gesunden Individuen gesammelt und im Vorfeld der Infektion auf das RHE-Gewebe gegeben. In dem in dieser Arbeit verwendeten, statischen RHE-Infektionsmodell wurde die Gewebeerstörung von *C. albicans* durch Speichel verzögert. Die aufgetragene Speichelschicht schien dabei eine physikalische Barriere darzustellen, welche der Pilz durchdringen musste. Wie in Abbildung 8 dargestellt, scheint die Interaktion von Pilzzellen und Epithelzellen in der mit Speichel inkubierten Probe auf oberflächlichere Bereiche beschränkt. Dies spiegelte sich auch in einer niedrigeren, extrazellulären LDH Aktivität wieder.

3.1.5 Kontakt zu Epithel induziert Hyphenbildung bei *C. albicans*

Kontakt zu biotischen oder abiotischen Oberflächen ist ein wichtiger Stimulus für die Hypheninduktion von *C. albicans* (Kumamoto and Vines, 2005). Um zu untersuchen, ob die Induktion der Hyphenbildung in der RHE Infektion initial auf eine Kontaktinduktion durch Epithelzellen zurückzuführen ist oder auf Stimuli in den Medien, wurden orale Epithelzellen mit *C. albicans* infiziert. Dazu wurden abgelöste TR146 Epithelzellen in einem Erlmeyerkolben (in PBS) bei 37°C, leicht schüttelnd, mit *C. albicans* inkubiert. Als Kontrolle wurden *C. albicans* Zellen unter den gleichen Bedingungen in PBS ohne Epithelzellen inkubiert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, führte die Inkubation (2 h) von *C. albicans* in PBS zu keiner Hypheninduktion (Abbildung 9, B). Gleiches galt für Pilzzellen in der Epithelzellenkultur, die keinen Kontakt zu den Epithelzellen hatten (C). Kam es zu einem physikalischen Kontakt zwischen Pilz- und Epithelzelle, führt dies zu einer

Anhaftung und der unmittelbaren Hypheninduktion (A). Dabei zeigten alle an die Epithelzellen adhärennten Pilzzellen eine Hypheninduktion. Die gleichen Ergebnisse wurden mit HEp2-Epithelzellen erzielt. Dies deutet an, dass Epithelzellen, bzw. der Kontakt zu epithelialen Oberflächen einen starken Stimulus für die Hypheninduktion in *C. albicans* darstellen.

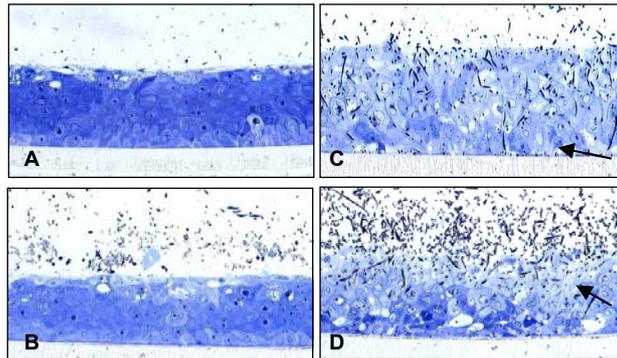


Abbildung 8. Inkubation von *C. albicans* mit dem RHE und Speichel

In den Abbildungen B (1 h) und D (24 h) sind histologische Schnitte der Interaktion von *C. albicans* mit Speichel, in den Abbildungen A (1 h) und C (24 h) ohne Speichel dargestellt. In den späten Zeitpunkten der Interaktion (24 h) scheint die Penetration von *C. albicans* in den Proben mit Speichel auf oberflächlichere Bereiche beschränkt zu bleiben, da weniger tief eingedrungene Pilzzellen im Gewebe sichtbar waren (Pfeile in den Abbildungen C und D).

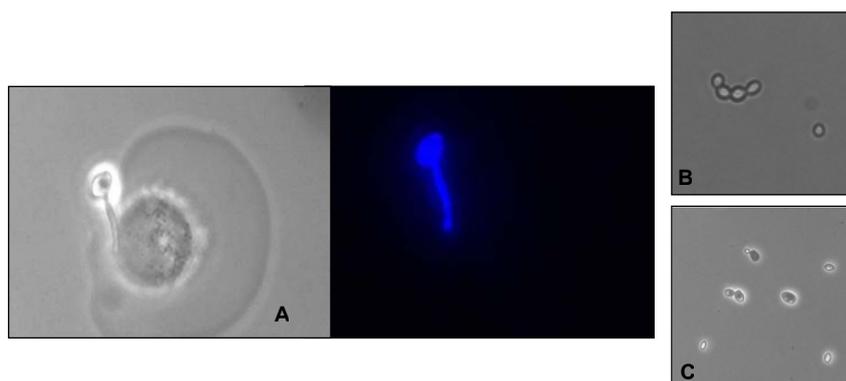


Abbildung 9. Kontakt zu Epithelzellen induziert den Hefe/Myzel Übergang

Abbildung A zeigt die Induktion der Hyphenbildung von einer *C. albicans* Zelle bei Kontakt zu einer Epithelzelle. *C. albicans* Zellen ohne Kontakt zu Epithelzellen (C) wuchsen in der Hefeform; ebenso die nur in PBS inkubierten Pilzzellen (B).

3.1.6 *C. albicans* adhärirt an Epithelzellen

Die Adhäsion an Oberflächen gilt als eine essentielle Voraussetzung für die Interaktionen von kommensalen oder pathogenen Organismen mit einem Wirt. Um das Adhäsionsverhalten von *C. albicans* an Epithelzellen zu quantifizieren, wurden Adhärenzanalysen mit verschiedenen Epithelzelllinien durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt die Adhärenz von *C. albicans* an HEp2 und TR146 Epithelzellen nach 1 h im Vergleich mit der apathogenen Hefe *S. cerevisiae*. Die Adhärenz von *C. albicans* war bei beiden Zelllinien vergleichbar hoch (38-40% der Zellen waren an die Epithelzellen angeheftet) und zeigte deutliche Unterschiede zum Adhärenzverhalten von *S. cerevisiae* (1-3%). Die Adhäsion von *C. albicans* an die Epithelzellen war ferner unabhängig von umgebenden Inkubationsmedien. Dabei wurden neben der standardmäßigen Inkubation in PBS-Puffer auch Vollmedien (YPD) und Minimalmedien (YNB, SD) getestet, deren Verwendung keinen signifikanten Einfluss auf das Adhärenzverhalten zeigte. Die Durchführung der Adhärenzexperimente bei einer Inkubationstemperatur von 30°C führte dagegen mit allen untersuchten Medien (PBS, YPD, SD, YNB) zu einer verminderten Adhärenz ($\leq 25\%$).

Die deutlich höhere Adhärenz von *C. albicans* im Vergleich zu *S. cerevisiae* an Epithelzellen steht in Einklang mit den Beobachtungen aus den oben beschriebenen Infektionsexperimenten mit dem oralen Epithelgewebe (RHE). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* zeigte *C. albicans* ein starkes Adhärenzverhalten an die Epithelzellen. Die Adhärenz an Epithelzellen zeigte sich unabhängig von umgebenden Medien und somit von der Verfügbarkeit von Nährstoffen, war aber abhängig von der Temperatur. Dies könnte bedingt sein durch die in diesem Fall konträr verlaufenden Stimuli: niedrige Temperaturen stellen einen starken Stimulus für das Wachstum in der Hefeform dar, der Kontakt zu Epithelzellen, wie gezeigt, dagegen einen starken Stimulus für die Induktion des Hyphenwachstums. Hyphen, so weiß man seit langem, haben eine viel ausgeprägtere Neigung zur Adhäsion als Hefezellen.

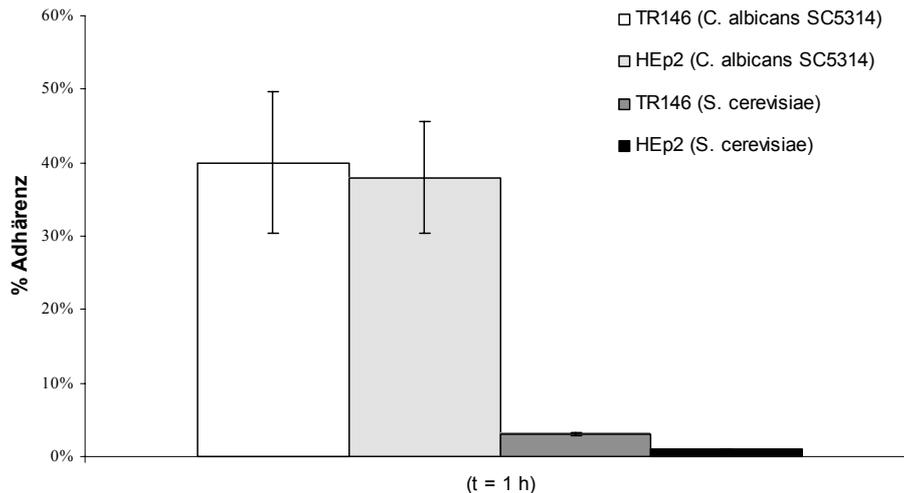


Abbildung 10. Adhärenz von *C. albicans* und *S. cerevisiae* an Epithelzellen

Das Diagramm stellt die prozentuale Adhärenz von *C. albicans* und *S. cerevisiae* Zellen an die Epithelzelllinien TR146 und HEp2 dar. Die Inkubation der Pilzzellen mit den Epithelzelllinien erfolgte für 1 h bei 37°C (in PBS).

In einem weiteren Schritt sollte auch die Adhärenz an das orale Epithelgewebe (RHE) bestimmt werden. Dies stellte sich jedoch als technisch sehr anspruchsvoll dar, da es sich bei dem verwendeten Material um ein mehrschichtiges Gewebe handelt. Der in dieser Arbeit standardmäßig verwendete Adhäsionsassay, basierend auf der Bestimmung von CFUs (*colony forming units*) zeigte auch nach mehreren Wiederholungen und verschiedensten Modifikationen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Der an das Gewebe adhärenzte prozentuale Anteil an Pilzzellen schwankte zwischen 10-80%, die sich im Überstand befindenden und nicht adhärenzten Zellen entsprechend zwischen 4-50%.

Entsprechend den Ergebnissen kann an dieser Stelle keine verlässliche Aussage darüber gemacht werden, ob es ein abweichendes Adhärenzverhalten von *C. albicans* an orales Epithelgewebe oder an Epithelzellen in Monolayer gibt.

3.1.7 *C. albicans* induziert Aktinakkumulation in Epithelzellen

C. albicans Interaktionen mit dem oralen Gewebe beinhalten sowohl Adhärenz an Epithelzellen als auch Invasion und Penetration in das Gewebe.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte nach Penetration des Epithelgewebes Membranhüllungen („Tunnelstrukturen“) der Hyphenzellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 4). Um zu untersuchen, ob an den in dem

Gewebe beobachteten Tunnelstrukturen möglicherweise epitheliale Zytoskelettstrukturen beteiligt sind, wurde in den infizierten Zellen eine Aktinfärbung vorgenommen. Für die Analyse wurden TR146 Zellen für 12 h mit *C. albicans* infiziert und die Zellen mit einem Aktinfarbstoff (Phallotoxin) gefärbt. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, war zu den späten Zeitpunkten der Interaktion für einige Hyphenzellen eine Aktinakkumulation in den Epithelzellen zu beobachten. *C. albicans* Zellen wurden in der hier verwendeten Inkubationszeit nicht durch den Aktinfarbstoff angefärbt. Diese Daten zeigen, dass es eine Beteiligung des Aktinzytoskelet der Epithelzellen an den invasiven Vorgängen von *C. albicans* zu geben scheint. Gegebenenfalls könnte dies auf Zellen zutreffen, die durch eine induzierte Phagozytose in die Zellen aufgenommen wurden (vgl. Abbildung 1). Um jedoch spezifischere Aussagen über diese Vorgänge machen zu können, müssten weiterführende zellbiologische Experimente durchgeführt werden.

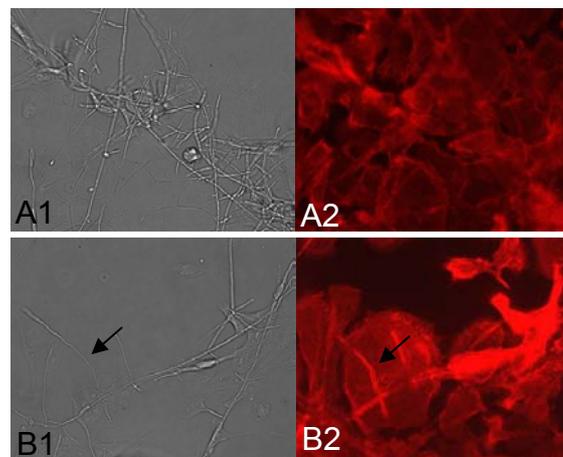


Abbildung 11. Aktinakkumulation in oralen Epithelzellen (TR146)

In den Abbildungen A und B ist die Interaktion von *C. albicans* Hyphenzellen mit oralen Epithelzellen dargestellt. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen (1) sind die Hyphenzellen dargestellt, der gleiche Ausschnitt (2) zeigt die Epithelzellen (Aktinfärbung). Die Tunnelstrukturen sind mit einem Pfeil markiert.

3.2 Transkriptionsprofile und infektionsassoziierte Gene

Basierend auf den Ergebnissen der mikroskopisch-zellulären Analyse der *C. albicans*/Epithelgewebe Interaktionen *in vitro* wurden die zellulären Vorgänge in den folgenden Schritten auf molekularer Ebene untersucht. Dazu sollte mit Hilfe von Mikroarrays Transkriptionsprofile von *C. albicans* Zellen während der Interaktion mit oralem Epithelgewebe erstellt werden. Für die Durchführung der Mikroarray-Experimente wurden *in vitro* und *in vivo* Proben verwendet. Bei den *in vitro* Proben handelte es sich um orales Epithelgewebe (RHE), welches über verschiedene Zeitpunkte (1-24 h) mit *C. albicans* infiziert wurde. Bei den *in vivo* Proben handelte es sich um orale Abstriche von HIV⁺ Patienten, welche an einer oralen, pseudomembranösen Candidose erkrankt waren. Von den verschiedenen Proben wurde die RNA präpariert und markiert und diese dann für die Hybridisierung der *C. albicans*-spezifischen Mikroarrays verwendet.

Ziel der Mikroarray Analyse war es, die Vorgänge bei den Interaktionen von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe besser zu verstehen und Gene zu identifizieren, die speziell an oralen Infektionen beteiligt sind. Für weiterführende Analysen wurden dazu 10 Gene anhand spezifischer Kriterien ausgewählt.

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Analyse der Transkriptionsprofile sowie die vergleichende Analyse der *in vitro* und *in vivo* Probenpools dargestellt. Die für weiterführende Untersuchungen ausgewählten Gene sowie die Auswahlkriterien sind in Abschnitt 3.2.4 (Auswahl neuer, potentiell infektionsassoziiertes Gene) erläutert.

3.2.1 Transkriptionsprofile bei RHE-Infektionen

Um die Interaktion von *C. albicans* mit oralem Gewebe *in vitro* auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde das RHE über verschiedene Zeiträume (1-24 h) mit *C. albicans* infiziert und die Transkriptionsprofile des Pilzes mit Hilfe von *C. albicans*-Mikroarrays zu den jeweiligen Zeitpunkten analysiert.

Bei der Hybridisierung von Mikroarrays stellten sowohl die Menge der für die Hybridisierung benötigten RNA, als auch deren Reinheit eine kritische Komponente dar. Um Limitierungen aufgrund zu geringer RNA-Mengen aus den Proben zu überwinden, wurde die RNA mit Hilfe der linearen Amplifikations-

Technik amplifiziert und markiert. Die Methode der „linearen Amplifikation“ stellt eine etablierte Methode dar, deren Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit bereits mehrfach gezeigt wurde (Pabon *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Neben einer kritischen Mindestmenge an Pilz-RNA stellte auch das Verhältnis zwischen humaner und *C. albicans* RNA in der Probe einen kritischen Faktor bei der technischen Durchführung der Mikroarrays dar. Mikroarrays, welche mit Proben hybridisiert wurden, die einen zu hohen Anteil an humaner RNA beinhalteten, ergaben insofern schlechte und nicht auswertbare Ergebnisse, als dass nur schwache Signale messbar waren. Für die Hybridisierung der Mikroarrays wurden daher nur Proben verwendet, die eine totale RNA Ratio von $\geq 2:1$ (Pilz:Human) aufwiesen. Das Verhältnis zwischen humaner und *C. albicans* RNA wurde, wie im Material- und Methodenteil (Abschnitt 2.2.11.2) beschrieben, mittels semiquantitative RT-PCR determiniert und quantifiziert. Um Kreuzhybridisierungen mit humaner RNA auf den *C. albicans* Mikroarray ausschließen zu können, wurde ein *C. albicans* Mikroarrays im Vorfeld der Studie mit humaner RNA hybridisiert und ausgewertet. Es konnten keine signifikanten Hybridisierungen mit humaner RNA festgestellt werden.

Basierend auf den mikroskopischen Analysen der experimentellen Epithelgewebe/*C.albicans* Interaktionen wurde bei der Analyse der Transkriptionsprofile ein besonderes Augenmerk auf die phasenspezifischen Wechselwirkungen und auf generelle, physiologische Aspekte gelegt. Wie in der mikroskopisch-zellulären Analyse zu beobachten war, finden in der frühen Phase der Interaktionen die kontaktinduzierten Reaktionen zwischen Pilzzellen und Epithelgewebe statt. Die späte Phase war charakterisiert durch Invasion und Zerstörung des Gewebes. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Schwerpunkt der Analyse auch auf diese beiden Phasen gelegt.

3.2.1.1 Analyse der Transkriptionsprofile der experimentellen RHE-Infektionen

Die durch die Hybridisierung der Mikroarrays gewonnenen Daten wurden mit einer speziellen Software zur Analyse von Mikroarrays ausgewertet (GeneSpring 7.0) und analysiert. Basierend auf stringenten Kriterien wurden die Gene für eine weiterführende Interpretation ausgewählt, für deren Expressionsdaten über den

gesamten Verlauf der experimentellen Infektion ein zuverlässiges Signal ermittelt werden konnte (robuste Genexpression). Im Verlauf der experimentellen Infektionen ergaben 4300 ORFs (~75%) ein zuverlässiges Signal für jeden untersuchten Zeitpunkt. 15% der Gene (662 Gene) waren mindestens während eines Zeitpunktes der experimentellen Infektionen >2-fach exprimiert. Einige Gene zeigten eine unveränderte Expression über den gesamten Verlauf (10%), der weitaus größte Teil der Gene zeigte eine heterogene Expression im Verlauf der experimentellen Infektionen (75%). In Abbildung 12 ist die Expression der Gene des robusten Datensatzes über den zeitlichen Verlauf (1 h-24 h) der experimentellen Infektion dargestellt. In der Abbildung ist dabei eine im Vergleich zu der *common reference* erhöhte Genexpression rot, eine unveränderte Expression gelb und eine verminderte Expression grün dargestellt.

Abbildung 13 zeigt eine Clusteranalyse der verschiedenen Zeitpunkte der experimentellen RHE Infektionen. Bei der hierarchischen Clusteranalyse CT, (*condition tree*, vertikal) wurden dabei die einzelnen Zeitpunkte der experimentellen Infektionen zueinander klassifiziert. Das Ergebnis der Analyse ist in einer hierarchischen Baumstruktur wiedergegeben, deren Äste die Ähnlichkeit der Elemente zueinander wiedergeben. Als Maß für die Ähnlichkeit der verschiedenen Äste zueinander wird die Distanz (d) angegeben. Sowohl die frühen (1 und 3 h) als auch die späten Zeitpunkte (12 und 24 h) wurden in der Clusteranalyse jeweils mit der größeren Ähnlichkeit zueinander klassifiziert, was auf ein ähnliches Expressionsmuster der Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten hindeutet. In der zeitlichen Anordnung wiesen die frühen (1 und 3 h) sowie die späten Zeitpunkte (12 und 24 h) die maximale Distanz (geringe Ähnlichkeit) zueinander auf, was zum einen die Verschiedenheit der Expressionsmuster dieser Gruppen andeutet und zum anderen ein sich über den zeitlichen Verlauf änderndes Transkriptionsprofil der untersuchten Populationen. Bei der Clusteranalyse GT (*gene tree*, horizontal) wurde die Expression der Gene über den zeitlich Verlauf klassifiziert. Dabei wurden die Gene nachbarschaftlich zueinander angeordnet, welche über den zeitlichen Verlauf eine ähnliche Expression aufwiesen. Dies zeigte sich in der Häufung der erhöht exprimierten Gene im unteren Teil (rot) und der gleich bzw. weniger stark exprimierten Gene (gelb und grün) im oberen Teil von Abbildung 13.

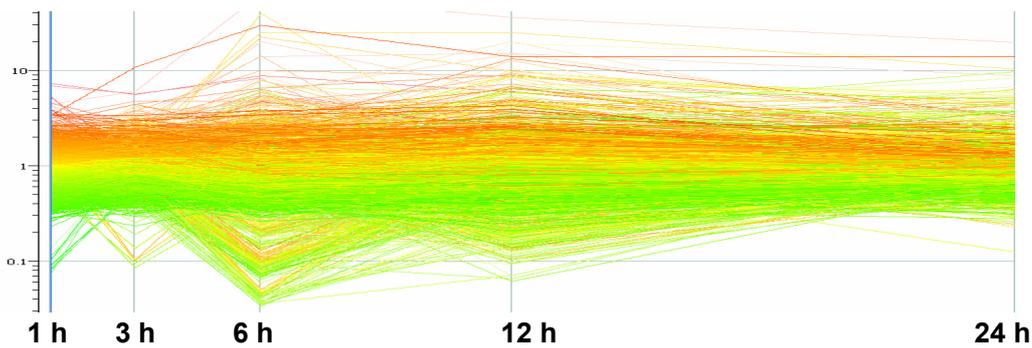


Abbildung 12. Darstellung der Genexpression über den zeitlichen Verlauf der experimentellen Infektion

Die Expression der Gene ist in Relation zu der co-hybridisierten *common reference* (RNA aus bei 37°C in YPD gewachsenen *C. albicans* Zellen, mittlere logarithmische Wachstumsphase) dargestellt. Eine stärkere Expression ist rot, eine unveränderte Expression gelb und eine verminderte Expression in grün dargestellt.

(Auf der y-Achse ist die normalisierte Genexpression aufgetragen. Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch dargestellt.)

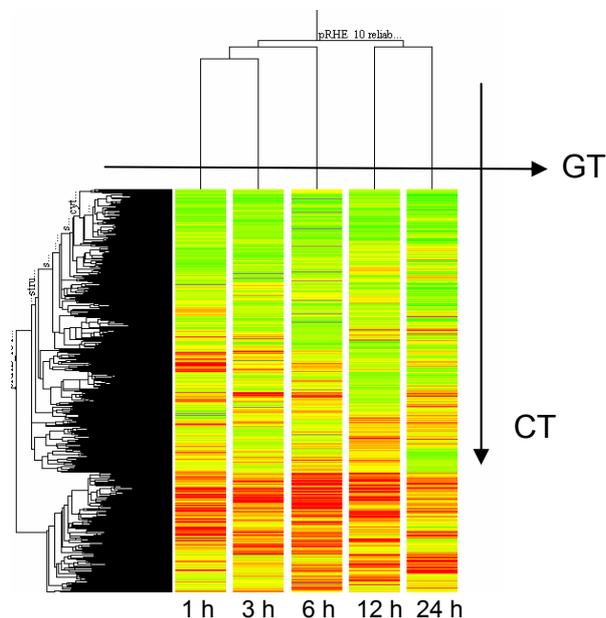


Abbildung 13. Hierarchische Clusteranalyse der verschiedenen Zeitpunkte der experimentellen RHE-Infektion

(CT, *condition tree*) Die frühen Zeitpunkte 1 h und 3 h ($d=0,38$) und die späten Zeitpunkte 12 h und 24 h ($d=0,5$) wiesen eine geringe Distanz (d) zueinander auf und waren in der Zeitreihe maximal weit voneinander entfernt ($d=0,68$).

(Für weiterführende Erklärungen siehe Text.)

3.2.1.2 Phasenspezifische Genexpression in den experimentellen RHE-Infektionen

Die Analyse der zeitlich variierenden Expression verschiedener Gene und Gengruppen führte zu der Identifizierung phasenspezifischer Expressionsmuster, welche in weiterführenden Analysen untersucht wurden. Für die Analyse berücksichtigt wurden nur der „robust exprimierte“ Datensatz, für weiterführende Analysen nur statistisch signifikant exprimierte Gene. In der frühen Phase (1 h) der experimentellen RHE-Infektion waren 164 Gene im Vergleich zu der *common reference* >2-fach hochreguliert, 32 dieser Gene waren statistisch signifikant und ausschließlich in der frühen Phase der Infektion stark exprimiert (siehe Anhang 8.1, Genliste 1). Bei dem weitaus größten Teil dieser Gene (19 Gene) handelte es sich um Gene mit unbekannter Funktion (*unknown function*), 9 Gene in dieser Gruppe hatten kein Ortholog in der verwandten Hefe *S. cerevisiae*. Die Genprodukte der in der frühen Phase hochregulierten Gene mit bekannter Funktion konnten vor allem Transkriptionsvorgängen und allgemeinen Stoffwechselfvorgängen zugeordnet werden (Abbildung 14). 114 Gene waren in der mittleren Phase der experimentellen Infektion (3 h und/oder 6 h) statistisch signifikant und >2-fach exprimiert. 27% dieser hochregulierten Gene waren ohne beschriebene Funktion in *C. albicans*, 50% der Genprodukte dieser Gruppe konnten Stoffwechselfunktionen zugeordnet werden (Abbildung 14). In der späten Phase der RHE Infektion (12 h und/oder 24 h) waren 85 Gene statistisch signifikant >2-fach hochreguliert (siehe Anhang 8.1, Genlisten 2A/B). Im Gegensatz zu den Genen der frühen Gruppe (1 h) waren nur 30% der Gene ohne beschriebene Funktion, die übrigen Gene kodierten für Proteine, die sich allgemeinen (Transporter, hydrolytische Enzyme) und spezielleren (pH regulierte Gene) Stoffwechselfvorgängen zuordnen ließen. 38 Gene waren über den gesamten Verlauf der experimentellen Infektion erhöht exprimiert ($\geq 1,5$ -fach), 23% dieser Gene waren ohne beschriebene Funktion in *C. albicans* (siehe Anhang 8.1, Genliste 3). Die Mehrheit der Gene mit beschriebener Funktion ließen sich den funktionellen Gruppen hyphenassoziiert, transkriptionsassoziiert oder allgemein stoffwechselfassoziiert zuordnen. Die phasenspezifische Expression und die Zusammensetzung der einzelnen Gengruppen sind in Abbildung 14 zusammengefasst.

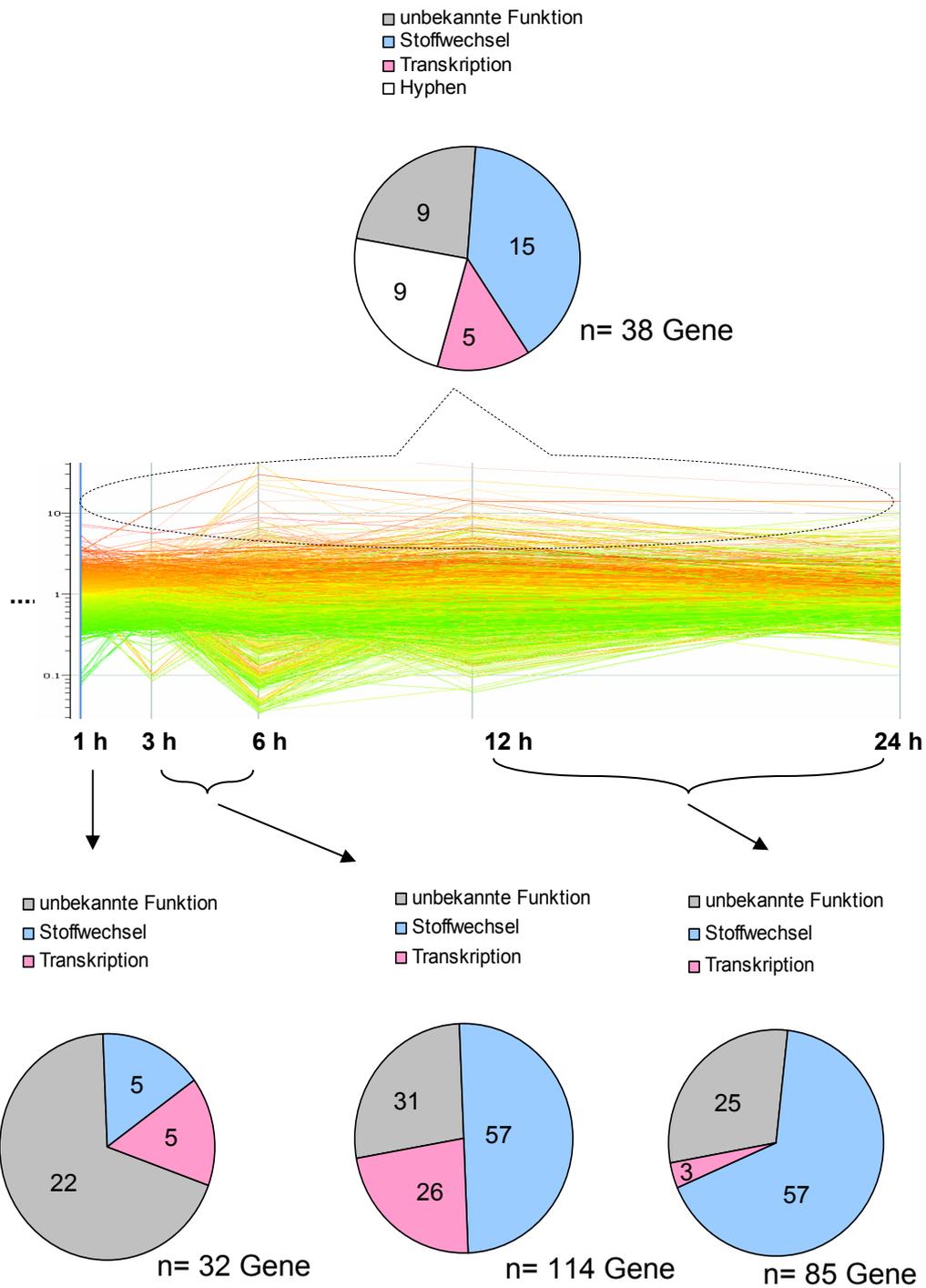


Abbildung 14. (Legende siehe nächste Seite)

Abbildung 14. Funktionelle Gruppen der während der experimentellen RHE-Infektion phasenspezifisch stark exprimierten Gene

38 Gene zeigten eine erhöhte Expression (>1,5-fach) über den gesamten Verlauf der experimentellen Infektion (1 h-24 h). 32 Gene waren ausschließlich während des frühen Zeitpunktes der experimentellen Infektion statistisch signifikant stark exprimiert (>2-fach), 114 Gene zeigte eine hohe Expression in der mittleren Phase (3 h und/oder 6 h), 85 Gene eine starke Expression während der späten Phase der Infektion (12 h und/oder 24 h). Die Anzahl der Gene der jeweiligen funktionellen Gruppe (unbekannte Funktion, stoffwechsel-, transkription- oder hyphenassoziiert) ist in den jeweiligen Abschnitten der Kugeldiagramme dargestellt.

3.2.1.3 Unterstützende RHE-Experimente

Um bestimmte Aspekte der experimentellen RHE-Infektion näher zu untersuchen, wurde der experimentelle Aufbau der RHE-Infektion modifiziert (unterstützende RHE-Experimente). Zum einen wurde RHE-Gewebe mechanisch zerstört und *C. albicans* mit dem zerstörten Gewebe inkubiert (disruptiertes RHE). Dazu wurde das Gewebe aus dem Trägernapf ausgeschnitten und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mechanisch zerstört. Das zerstörte Gewebe wurde anschließend wieder auf die Trägermembran gegeben und wie zuvor mit *C. albicans* Zellen inkubiert. Hypothese dabei war es, Gengruppen herauszufiltern, die für die Interaktion mit dem Inhalt der Zelle sowie den zerstörten Strukturen wichtig sind, wie es möglicherweise in der späten Phase der Infektion der Fall ist. Zum anderen wurde *C. albicans* mit dem RHE inkubiert, wobei eine Polykarbonmembran den physikalischen Kontakt zwischen Pilz- und Epithelzellen verhinderte (ohne Kontakt). Die *C. albicans* Zellen und das Epithel wurden durch eine trennende Membran miteinander inkubiert, abzielend auf die Identifikation von Genen, die für den spezifischen Kontakt zwischen Pilz- und Wirtszellen wichtig sein könnten.

Die Mikroarray Analyse der unterstützenden Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und nur zu vergleichenden Analysen berücksichtigt.

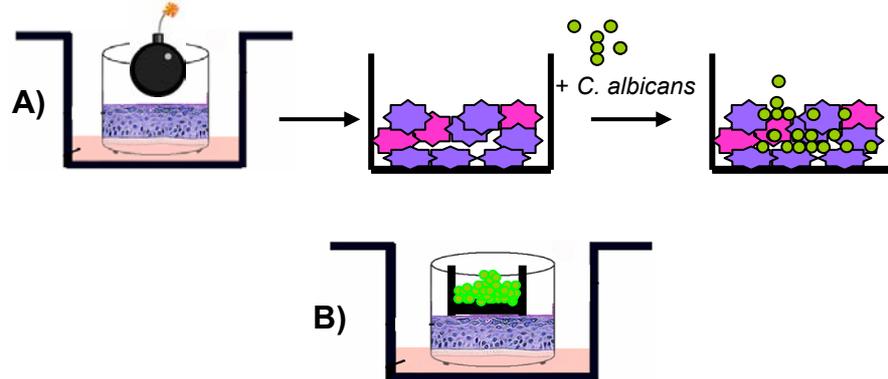


Abbildung 15. Unterstützende Experimente der experimentellen RHE Infektion

(A) Das RHE wurde für die Experimente mit dem „disruptierten RHE“ mechanisch zerstört. Bei dem „ohne Kontakt“ Experiment (B) wurden die *C. albicans* Zellen auf einer Membran mit dem RHE inkubiert, so dass kein Kontakt zwischen den Pilz- und Epithelzellen zustande kommen konnte.

Die Inkubation mit dem disruptierten RHE wurde über 3 h und 6 h durchgeführt. Die individuell für jedes Experiment durchgeführte Datenanalyse ergab für das Experiment mit dem disruptierten RHE einen robusten Datensatz von ~5400 Genen (90%). 11% der Gene (641 Gene) zeigten eine Hochregulation von >2-fach zu mindestens einem Zeitpunkt des Experiments. Etwa ein Drittel der Gene zeigte eine unveränderte Expression während allen untersuchten Zeitpunkten.

Für die „ohne Kontakt“ Experimente wurden die Zeitpunkte 1, 6, 12 und 24 h untersucht. Der ermittelte robuste Datensatz bestand für das „ohne Kontakt“ Experiment aus ~4600 Genen (78%). Für 21% der Gene wurde eine unveränderte Expression über den gesamten Verlauf des Experiments gemessen. 11% der Gene (533 Gene) zeigten eine hohe Expression (>2-fach) während mindestens einem der Zeitpunkte.

3.2.1.4 Das Transkriptionsprofil spiegelt Anpassung an das orale Epithelgewebe wider

Das Transkriptionsprofil der mittleren und späten Phase spiegelte die adaptive Interaktion mit dem Gewebe wider, was durch die erhöhte Expression bestimmter Markergene und Gengruppen angedeutet wurde. So zeigte das Transkriptionsprofil deutlich die Induktion und Hochregulation hyphenassoziierter

Gene über den Verlauf der experimentellen Infektion (Abbildung 16, A2). Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen nach den mikroskopischen Beobachtungen, bei denen eine Hypheninduktion unmittelbar nach Kontakt zu den Epithelzellen zu beobachten gewesen war. In den späteren Zeitpunkten der experimentellen Infektion wurde durch die Hochregulation des Glukosetransportergens *HGT12*, der Maltosetransportergene *MAL31* und *MAL2* sowie der hohen Expression von Schlüsselgenen der Glukoneogenese und des Glyoxylat Zyklus (*PCK1*, *ICL1*, *MLS1*, *ENO1* und *GPM1*) eine Veränderung der genutzten Kohlenstoffquellen angedeutet. Für Hgt12p konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um einen bei niedrigen Glukosekonzentrationen induzierten Transporter handelt (Fan *et al.*, 2002). Bei der anstelle von Glukose verwendeten Kohlenstoffquelle könnte es sich zum Beispiel um Lipide, genauer um Fettsäuren oder Phospholipide handeln, die bei der Zerstörung und Interaktion mit Gewebe und Zellen genutzt werden könnten. Dies wurde impliziert durch die Hochregulation von Genen, deren Genprodukte an der β -Oxidation und der Lipolyse beteiligt sind (*FOX2*, *PXA1*, *POT1*, *POT11*). Auch ein Mitglied der Lipase-Genfamilie (*LIP1*), für das eine erhöhte Expression unter lipidreichen Bedingungen bereits gezeigt werden konnte (Hube *et al.*, 2000), war auf erhöhtem Niveau exprimiert. Einige Gene der β -Oxidation und Lipolyse waren auch in dem unterstützenden Experiment mit dem disruptieren RHE auf hohem Niveau exprimiert. Dies deutete an, dass diese Genprodukte eine wichtige Rolle bei der Invasion und dem Kontakt mit Zellinhaltsstoffen spielen könnten. Um weitere, wichtige Nährstoffe zu erhalten, exprimierte *C. albicans* ferner eine Reihe von Transportergenen, deren Genprodukte mit der Aufnahme von Aminosäuren (*DIP5*, *GNP1*, *AGP2*, *CAR1* und *CAR2*), Phosphat (*MIR1*, *PHO84*) oder Zink (*ZRT1*, *ZRT2*) assoziiert sind auf deutlich erhöhtem Niveau. Auch die für hydrolytische Enzyme kodierenden Gene *SAP5* und *SAP9* sind in den späteren Phasen auf erhöhtem Niveau exprimiert.

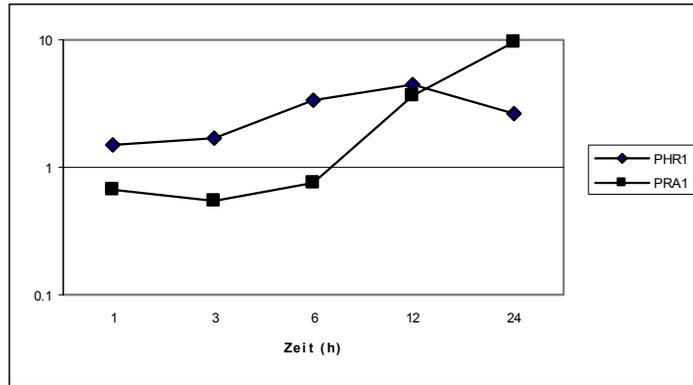
Die Interaktion mit dem Wirt bedeutet für das Pathogen oftmals Stress infolge der Anpassung an die Umgebung oder das veränderte Nahrungsangebot, oft aber auch temperaturbedingten, oxidativen oder osmotischen Stress. Abgesehen von vereinzelt leicht erhöht exprimierten Stressgenen (*HSP30*, *HSP60*, *CTA1*) zeigte *C. albicans* eine deutliche Stressantwort nur auf nitrosativen (NO^{\cdot}) Stress. In den späten Phasen der RHE Infektion reflektiert die erhöhte Expression der

Markergene *YHB5* und *SSU1* eine Detoxifizierung reaktiver Stickstoffspezies (NO^{\cdot}) (Hromatka *et al.*, 2005). Für die genannten Gene wurde in den späten Zeitpunkten der unterstützenden Experimente („disruptiert“ und „ohne Kontakt“) keine erhöhte Genexpression nachgewiesen. Dies impliziert, dass nur der direkte Kontakt zu lebenden Epithelzellen NO^{\cdot} - assoziierten Stress in *C. albicans* induziert. Im Verlauf der experimentellen Infektion war ebenfalls eine Induktion und Hochregulation von pH-abhängigen Markergenen zu beobachten. *PHR1* und *PRA1*, beides Gene, deren Induktion alkalische Umgebungsbedingungen widerspiegeln, waren in den späten Phasen >2-fach hochreguliert. Darüber hinaus waren einige weitere Gene hochreguliert, welche mit alkalischen Umgebungsbedingungen assoziiert werden konnten. (vgl. Tabelle 2)

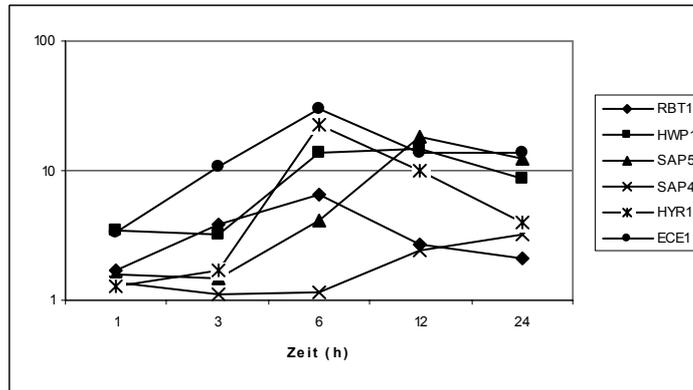
Zur Überprüfung der Mikroarraydaten wurde die Expression einiger, ausgewählter Gene mit der Real-Time PCR Technik (TaqMan) quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte dabei relativ zu der auch für die Mikroarrayexperimente verwendete *common reference*. Die relative Quantifizierung erfolgte in jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit biologischen Replikaten in 4-facher Bestimmung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16, B dargestellt.

Abbildung 16, A)

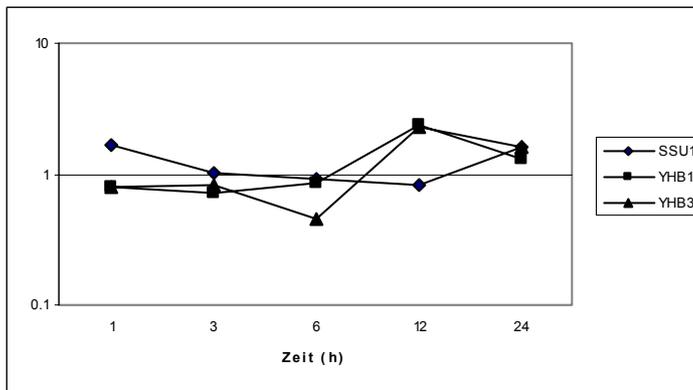
1).
pH-Wert assoziierte
Gene



2).
Hyphenassoziierte
Gene



3).
Stress (NO⁺)
assoziierte Gene



4).
Kontrolle

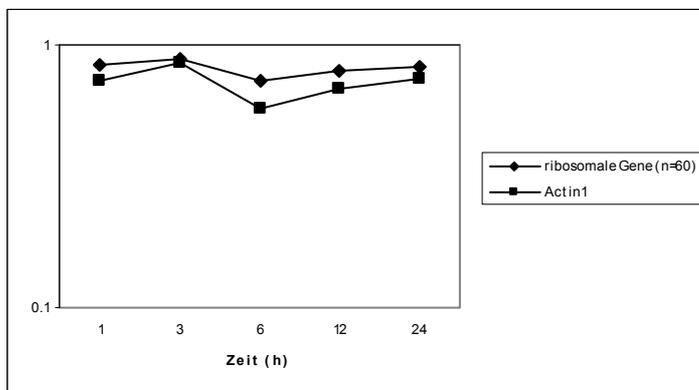


Abbildung 16, B)

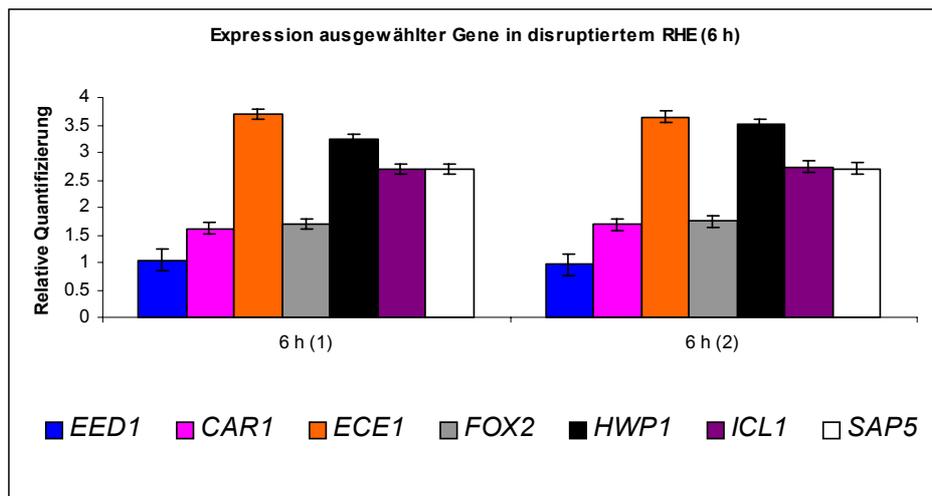
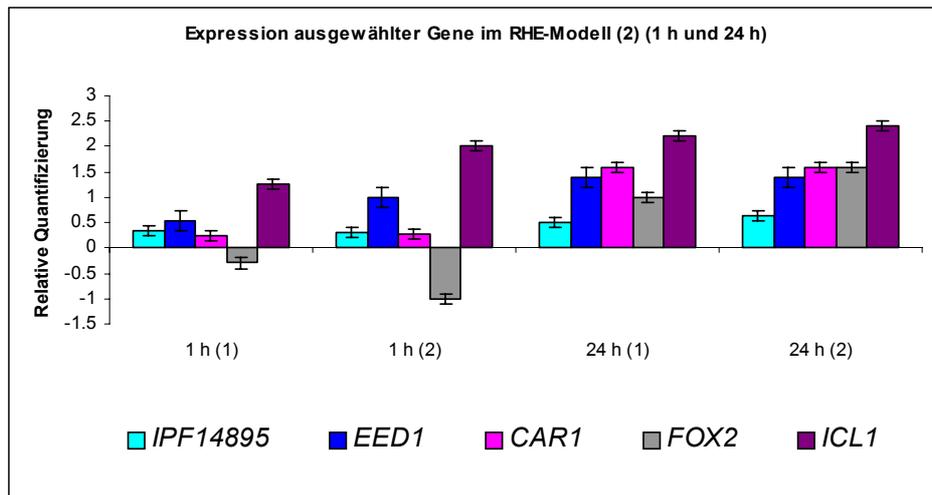
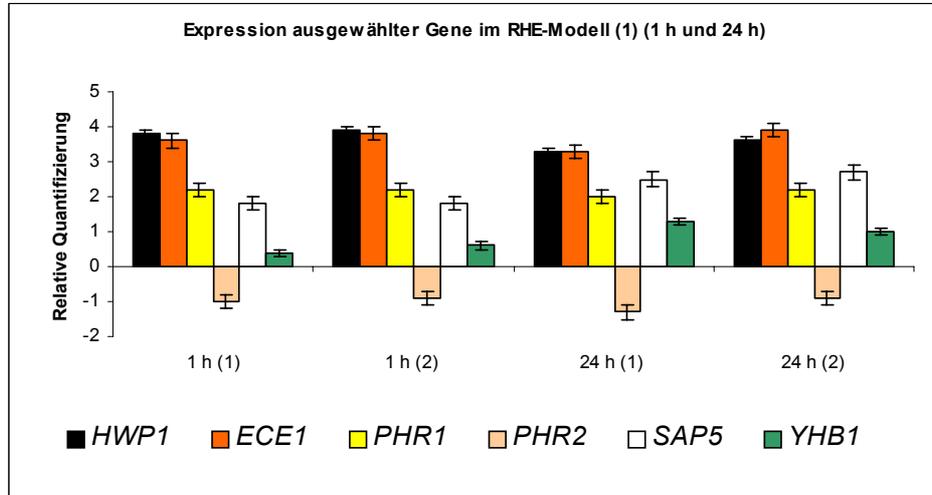


Abbildung 16. Graphische Darstellung der Expression ausgewählter Gene in der experimentellen RHE-Infektion (1 h-24 h)

A) Mikroarrayexperimente: In den Diagrammen ist die statistisch signifikante Genexpression ausgewählter Gengruppen (1-4) über einen Zeitraum von 1 h-24 h dargestellt. Als Kontrolle ist die weitgehend unveränderte Expression des Aktin Gens *Act1* und die durchschnittliche Expression einiger ribosomaler Gene (n=60) angegeben (4). (Auf der y-Achse ist die normalisierte Genexpression aufgetragen, die Skalierung der y-Achsen ist logarithmisch dargestellt.)

B) Quantitative Real-Time PCR: Die Expression einiger ausgewählter Gene wurde durch Quantitative Real-Time PCR (TaqMan) überprüft. Wie bei den Mikroarrayexperimenten auch wurde die Expression der Gene in der den Real-Time PCR Experimenten relativ zu der *common reference* quantifiziert.

3.2.2 Patientenproben

Neben den Proben aus den experimentellen RHE Infektionen wurde für die Erstellung von Transkriptionsprofilen in dieser Arbeit auch *in vivo* Proben verwendet. Dazu wurden Abstriche von europäischen HIV⁺ Patienten (<200 CD4⁺ Zellen/ μ l) verwendet, die an einer oralen Candidose erkrankt waren. Von den 30 gesammelten Proben konnte aus elf Proben genügend RNA isoliert und für die Hybridisierung von *C. albicans* Mikroarrays verwendet werden. Dazu wurde anhand einer TaqMan PCR zuerst die Menge an Pilz-RNA bestimmt, da für die lineare Amplifizierung der RNA Proben mindestens 50 ng totale RNA benötigt wurde (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.11.3). Ein weiteres sehr wichtiges Kriterium war das quantitative Verhältnis zwischen humaner und *C. albicans* RNA. Optimale Ergebnisse wurden dabei mit der Hybridisierung von RNA Proben erzielt, die mindestens ein Verhältnis von 2:1 (Pilz-Human) totaler RNA zeigten. Wie bei den RHE-Proben auch, wurde die RNA aus den Patientenproben auf den *C. albicans* Mikroarrays mit einer *common reference* co-hybridisiert, was zudem eine vergleichende Analyse der *in vitro* und *in vivo* Proben erleichterte.

Wie zu erwarten war, stellte sich das Transkriptionsprofil der Patientenproben als sehr heterogen dar. Eine Clusteranalyse der Patientenproben zeigte eine große Heterogenität zwischen den einzelnen Patientenproben und eine unerwartet geringe Anzahl an Genen, welche in den verschiedenen Patientenproben gleich oder sehr ähnlich exprimiert waren (Abbildung 18).

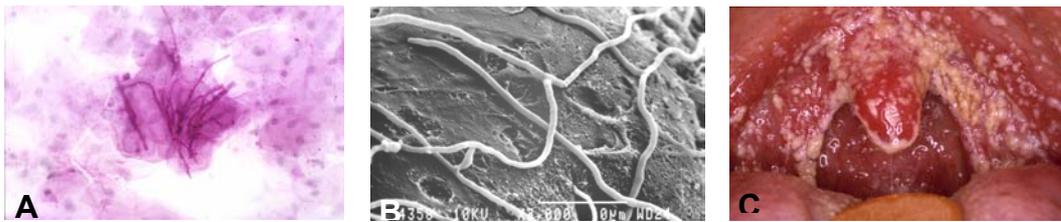


Abbildung 17. Patientenproben

In der Abbildung sind eine histochemische PAS-Färbung (A) und eine REM-Analyse (B) von *C. albicans* in oralen Patientenproben dargestellt. (C) gibt die Manifestation einer pseudomembranösen *C. albicans* Infektion in der Mundhöhle wieder. Deutlich zu sehen sind die weißen, pseudomembranösen Plaques auf der Mundschleimhaut im hinteren Rachenbereich.

(Mit freundlicher Genehmigung von A. Schmidt-Westhausen)

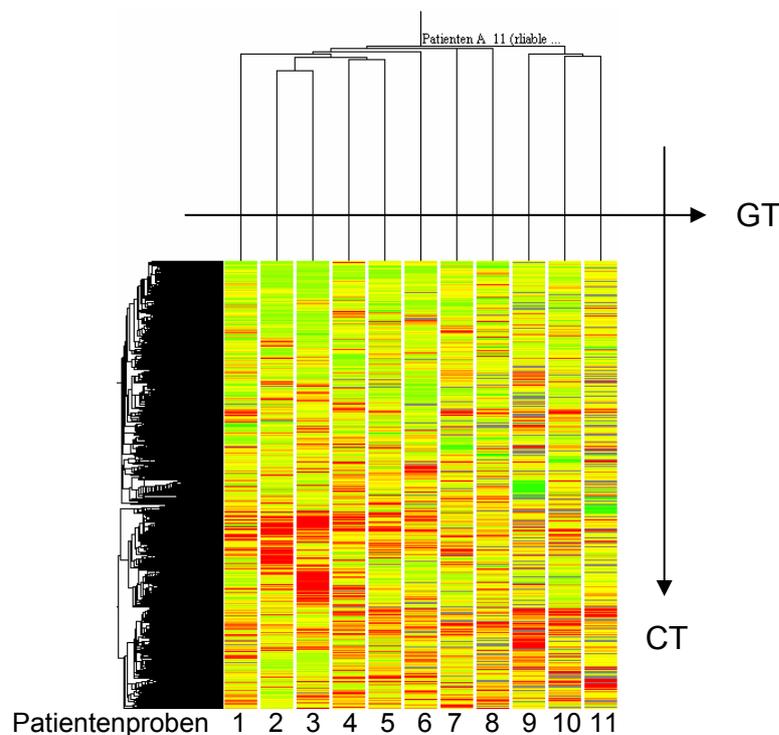


Abbildung 18. Clusteranalyse der Patientenproben (n=11)

Die Clusteranalyse verdeutlicht die Heterogenität der verschiedenen Patientenproben untereinander. Die Transkriptionsprofile der einzelnen Patienten zeigten zum einen keine großen Ähnlichkeiten zueinander auf (*condition tree*, CT, Clusteranalyse der einzelnen Proben als individuelle Komponenten), angedeutet durch große Distanzen (d) zwischen den Proben ($d=0,6-0,9$). Zum anderen zeigte die horizontale Clusteranalyse der Expression der einzelnen Gene (*gene tree*, GT) in den Proben kaum Cluster, die sich in allen Patientenproben wiederfinden (angedeutet durch gleichfarbige Bereiche, die sich über mehrere Patientenproben erstrecken).

3.2.2.1 Analyse der Transkriptionsprofile der Patientenproben

Die Analyse der Patientenproben zeigte für 86% (~5100 Gene) der Gene eine robuste Expression in allen Proben. Für weiterführende Analysen wurden auch in den Patientenproben nur statistisch signifikant exprimierte Gene verwendet.

In den Patientenproben zeigten 195 Gene eine statistisch signifikant erhöhte Expression (>1,5-fach) (siehe Anhang 8.1, Genliste 4). 27% der Gene (53) waren >2-fach exprimiert. Für die Mehrheit der Gene, welche in den Patientenproben eine erhöhte Expression zeigten (96 Gene), ist in *C. albicans* noch keine genaue Funktion bekannt. Unter den in den Patientenproben erhöht exprimierten Genen waren zahlreiche hyphenassoziierte Gene (Abbildung 19). Dies deutet an, dass die elongierte Hyphenmorphologie eine vorherrschende Form *in vivo* darstellt. In den Patientenproben war eine ganze Reihe von Genen, die *in vitro* bei alkalischem pH Wert induziert sind, einschließlich des Markergen *PHR1*, erhöht exprimiert. Die Expression dieser Gene impliziert, dass *C. albicans* Zellen *in vivo* von einem alkalisch-neutralen pH-Milieu umgeben sind. Die Hochregulation eines für einen Glukosetransporter kodierenden Gens (*HGT12*) sowie von Genen, die mit Maltosetransportern assoziiert werden, (*MAL31*, *MAL2*) deutete auf einen Mangel an frei verfügbarer Glucose hin. Diese Annahme wurde durch die hohe Expression von *ICL1*, einem Schlüsselgen des Glyoxylatzyklus, unterstützt. Zahlreiche für Transporter (z.B. Ionen, Aminosäuren) kodierende sowie in den Eisenmetabolismus involvierte Gene (Abbildung 19) waren in den Patientenproben unter den hochregulierten Genen zu finden. Eine intensive Interaktion mit dem oralen Gewebe wurde durch die hohe Expression von Genen angedeutet, die an der Detoxifizierung von Stickstoffmonoxid (NO[•]) beteiligt sind (Abbildung 19). Auch die Expression von Genen, die für hydrolytische Enzyme kodierten (*PLD1*, *SAP4*, *SAP5*, *PLB3*) sowie einer ganzen Reihe zellwand- und adhärenzassoziierter Gene deuteten auf eine Interaktion mit dem oralen Gewebe hin (Abbildung 19).

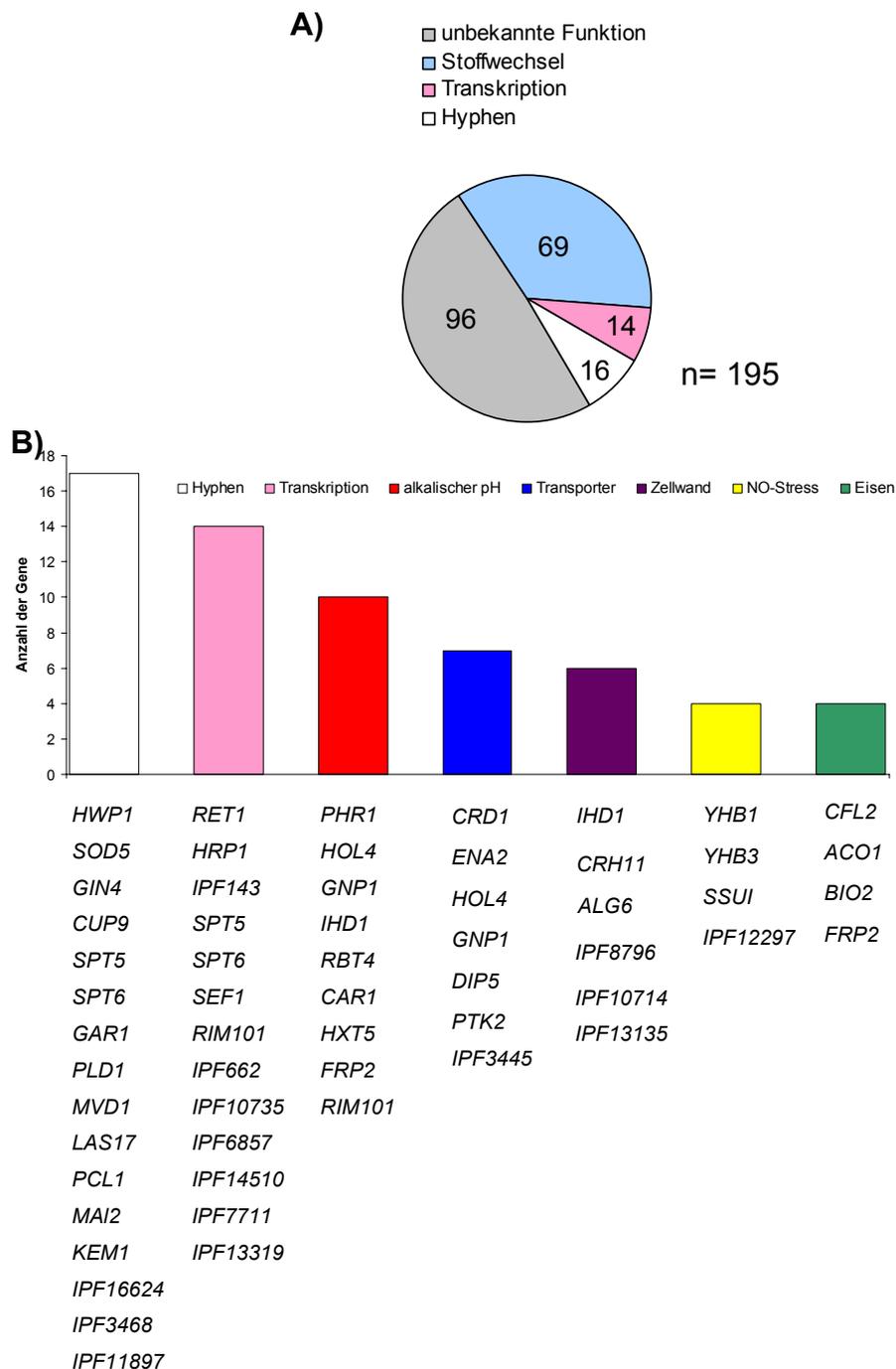


Abbildung 19. Statistisch signifikant erhöht (>1,5-fach) exprimierte Gene in den Patientenproben

(A) 195 Gene zeigten eine statistisch signifikant erhöhte Expression in allen Patientenproben. Die Mehrheit der Gene (96 Gene) war ohne beschriebene Funktion in *C. albicans*. (B) Ein große Anzahl der Gene deren Funktion in *C. albicans* bekannt ist, konnten als hyphen- transkriptions- oder stoffwechselassoziiert beschrieben werden. Einige bekannte Gene sind in dem Diagramm, basierend auf der Zuordnung zu den entsprechenden Vorgängen, dargestellt. So konnten die Funktion von z.B. 16 Genen als hyphenassoziiert von 6 Genen als zellwandassoziiert und von 4 Genen als eisenassoziiert klassifiziert werden.

3.2.3 Die *in vivo* und die *in vitro* Proben zeigen Übereinstimmungen in ihren Transkriptionsprofilen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben handelte es sich zum einen um Proben aus *in vitro* infiziertem oralem Epithelgewebe, welches als Modell für eine orale Candidose verwendet wurde. Zum anderen wurden Proben verwendet, die *in vivo* aus der Mundhöhle von an einer oralen Candidose erkrankten Patienten isoliert wurden. Um die Ergebnisse der experimentellen Infektion des epithelialen Gewebes mit der *in vivo* Situation zu vergleichen, wurden die erstellten Transkriptionsprofile beider Probengruppen einer vergleichenden Analyse unterzogen.

Zwischen den in der frühen Phase der experimentellen RHE Infektion signifikant hochregulierten Genen und den in den Patientenproben signifikant hochregulierten Genen konnte keine übereinstimmende Genexpression gefunden werden. Die Übereinstimmung dieser Gruppen bestand aus lediglich einem Gen, *IPF2287*, dessen Funktion in *C. albicans* noch nicht beschrieben ist. Deutliche Übereinstimmungen in der Genexpression konnte zwischen den Patientenproben und den späten Phasen der experimentellen RHE Infektion identifiziert werden. Ein großer Teil der Gene die über den gesamten Verlauf der experimentellen Infektion erhöht exprimiert wurden, waren auch in den Patientenproben erhöht exprimiert. Übereinstimmend zeigten sich in beiden Probengruppen hyphenassoziierte Gene (z.B. *HWP1*, *SOD5*) hochreguliert. Stoffwechselassoziierte Gene (z.B. *HGT12*, *ICL1*, *PCK1*, *MAL31*) oder Gene, die für Transporter kodierten (*ZRT1*, *GNP1*), implizierten übereinstimmende nahrungsphysiologische Aspekte in den verschiedenen Proben. Auch die Markergene, die mit einer Detoxifizierung von radikalen Stickstoffspezies (NO[•]) assoziiert werden können, waren sowohl in den Patientenproben als auch in den experimentellen Gewebeproben hochreguliert. Hinsichtlich des die *C. albicans* Zellen umgebenden pH- Milieus waren sowohl in den *in vivo* als auch den *in vitro* Proben deutliche Hinweise für ein neutral-alkalisches Milieu zu finden: das für alkalischen pH-Wert indikative Markergen *PHR1* sowie weitere bei alkalischen pH-Werten induzierte Gene waren deutlich in den Gewebe- und den Patientenproben hochreguliert (vgl. Tabelle 2).

Gene	RHE- späte Phase (t=24 h)	Patienten- proben
<i>PUT1</i>	4,4-fache Expression	2,3-fache Expression
<i>CAR1</i>	4,6	1,8
<i>ZRT1</i>	6,3	2,5
<i>FRP2</i>	12	2
<i>ECE1</i>	13	2,8
<i>HWP1</i>	8,5	2,3
<i>HYR1</i>	4	1,8
<i>IHD1</i>	5,2	3
<i>PHR1</i>	2,5	2,5
<i>GAP1</i>	0,7	0,7
<i>MAL31</i>	11	17

Tabelle 2. In den Patientenproben und der späten Phase der experimentellen RHE-Infektion übereinstimmend exprimierte Gene

Die Tabelle gibt einige bei alkalischem pH-Wert induzierte Gene wieder, die in den Patientenproben und in den RHE-Proben (24 h) auf vergleichbarem Niveau exprimiert wurden.

Die vergleichende Analyse zeigte eine basale Übereinstimmung zwischen dem Modell der oralen Infektion (RHE-Gewebeproben) und der *in vivo* Situation, repräsentiert durch die Patientenproben. In beiden Probenpools scheinen vor allem adaptive Mechanismen an das epitheliale Umfeld eine Rolle zu spielen, wobei sowohl die Anpassung von *C. albicans* an das veränderte Nahrungsangebot als auch an epitheliale Abwehrmechanismen Herausforderungen für die Pilzzellen darstellen.

In Abbildung 20 sind einige Ergebnisse der Analyse der Transkriptionsprofile in einem Diagramm zusammengefasst dargestellt. Teil (A) fasst die Ergebnisse aus der Gruppierung der in den einzelnen Zeitpunkten hochregulierten (>2-fach) Gene zusammen. Während in den frühen Zeitpunkten der experimentellen RHE-Infektion prozentual mehr Gene mit Transkriptionsvorgängen assoziiert werden konnten (roter Pfeil), waren in den späten Zeitpunkten mehr Gene auf hohem Niveau exprimiert, deren Genprodukte Stoffwechselfvorgängen zugeordnet werden konnten (blauer Pfeil). Der prozentuale Anteil an Genen ohne bekannte Funktion in den Gruppen der hochexprimierten Gene (>2-fach) reduzierte sich im Verlauf der experimentellen Infektion (grauer Pfeil). Im Abschnitt (B) der Abbildung ist die Expression einiger Gengruppen in den zeitlichen Verlauf der experimentellen

Infektion eingeordnet (gelbe Pfeile). Einige dieser Gengruppen zeigten sich auch in den Patientenproben auf hohem Niveau exprimiert (grüne Balken).

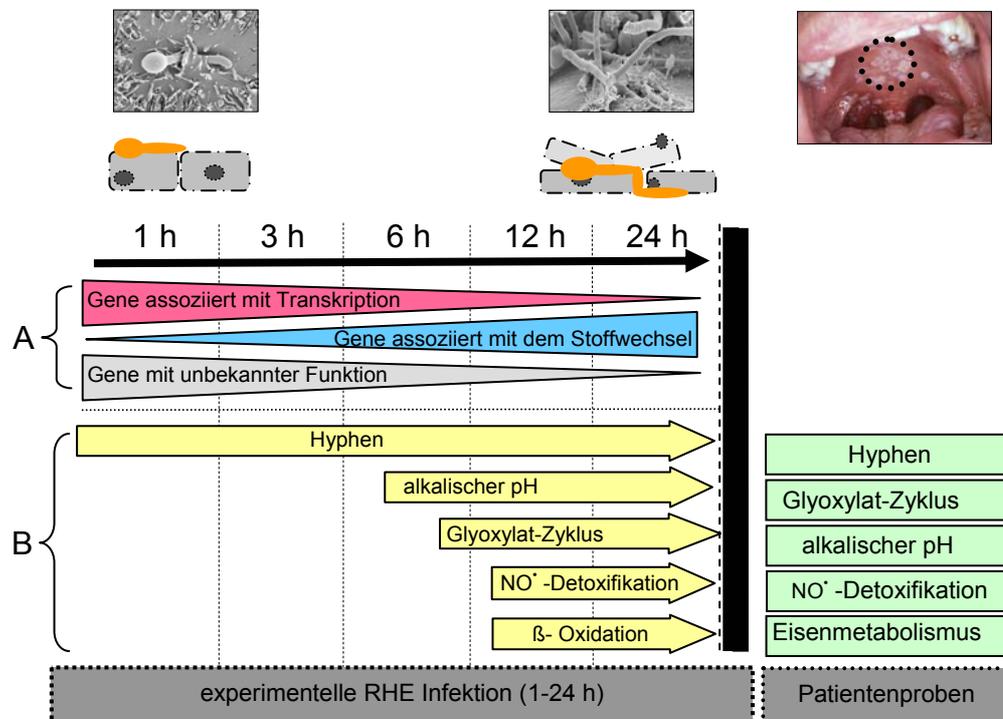


Abbildung 20. Experimentelle (RHE) Infektion und Patientenproben
(für Erläuterungen siehe Text)

3.2.4 Auswahl neuer, potentiell infektionsassoziierter Gene

Ein Ziel der Analyse der verschiedenen Transkriptionsprofile war es anhand spezifischer Expressionskriterien neue, potentiell infektionsassoziierte Gene zu identifizieren. Dazu wurden die Transkriptionsprofile detailliert analysiert und 10 Gene für eine weiterführende Analyse ausgewählt. Die Kriterien für die Auswahl der Gene basierten zum einen auf einer phasenspezifischen Expression in der experimentellen RHE-Infektion. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Gene gelegt, die entweder in der frühen oder in der späten Phase erhöht exprimiert wurden, basierend auf der Hypothese, dass die frühe Phase die Initiation der Infektion und die späte Phase die Persistenz der Infektion darstellt. Zum anderen wurde ein weiterer Schwerpunkt auf Gene gelegt, die sowohl in der

experimentellen RHE-Infektion als auch in den Patientenproben erhöht exprimiert wurden. Zusätzlich wurde auch die Expression der gewählten Gene in den „unterstützenden Experimenten“ mit in die Analyse eingeschlossen, ebenso wie die putativen Lokalisationen der abgeleiteten Proteine.

Für die Gene, welche aus den frühen Phasen der RHE-Infektion ausgewählt wurden, wurde ein Augenmerk auf die potentielle Membranständigkeit der entsprechenden Proteine gelegt. Die Arbeitshypothese dabei war, dass solche Proteine als potentielle Sensoren, Adhäsine oder Faktoren mit anderen Funktionen für die „Kontaktaufnahme“ von Bedeutung sein könnten. Bei den aus der späten Phase der RHE-Infektion und den Patientenproben gewählten Genen wurden zum Teil Gene gewählt, die auch nach Interaktion mit dem disruptierten RHE auf erhöhtem Niveau exprimiert waren. Diese Gene könnten eine wichtige Rolle bei der Invasion in das Gewebe spielen.

Anhand der beschriebenen Kriterien wurden die in Tabelle 3 dargestellten Gene für eine weiterführende Analyse ausgewählt. Dazu wurden die ausgewählten Gene im ersten Schritt ausgeschaltete und die erstellten Deletionsmutanten weiterführend analysiert.

Die gewählten Gene sowie die Auswahlkriterien der Gene sind in Tabelle 3 dargestellt.

Gen	Expressionsdaten	putative Lokalisation
<i>IPF2830</i>	>2-fach exprimiert nur während der frühen Phase (1 h) (RHE)	membranständiges Protein
<i>IPF2147</i>	>2-fach exprimiert nur während der frühen Phase (1 h) (RHE)	membranständiges Protein
<i>IPF4126</i>	>2-fach exprimiert während den frühen/mittleren Phasen (1h, 3 h) (RHE)*	membranständiges Protein
<i>IPF6758</i>	>2-fach exprimiert während den frühen/mittleren Phasen (1 h, 3 h) (RHE) >2-fach exprimiert in "disruptiertem" RHE	membranständiges Protein
<i>IPF14895</i>	> 1,5-fach exprimiert während der späten Phase (24 h) (RHE) >2-fach in "disruptiertem" RHE	lösliches Protein
<i>IPF946</i> (<i>EED1</i>)	>2-fach exprimiert während der frühen Phase (1 h) (RHE) >2-fach exprimiert während der späten Phase (12 h, 24 h) (RHE) * >2-fach exprimiert in "disruptiertem" RHE* >2-fach exprimiert in den Patientenproben	lösliches Protein
<i>IPF12297</i>	>2-fach exprimiert während der mittleren Phase (6 h) (RHE)* >2-fach exprimiert in später Phase "disruptiertes" RHE	membranständiges Protein
<i>MAL31</i>	>2-fach exprimiert in "disruptiertem" RHE >2-fach exprimiert in den Patientenproben >2-fach exprimiert während der späten Phase (12 h, 24 h) (RHE)	membranständiges Protein
<i>IPF14155</i>	>2-fach exprimiert in allen Zeitpunkten (RHE)* >2-fach exprimiert in den Patientenproben	lösliches Protein
<i>GTR1</i>	> 2-fach exprimiert in den Patientenproben >2-fach exprimiert während den frühen/mittleren Phasen (1 h, 3 h) (RHE)*	lösliches Protein

Tabelle 3. Gene die anhand der spezifischer Expressionskriterien für die Erstellung von Deletionsmutanten ausgewählt wurden

Für die weiterführende Analyse sowie für die Erstellung von Deletionsmutanten wurden Gene mit spezifischen Expressionsmustern ausgewählt. Ferner wurde die putative Lokalisation der Genprodukte berücksichtigt. Es wurden nur Gene mit einer starken Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten berücksichtigt.

(* starke Expression, jedoch nicht statistisch signifikant)

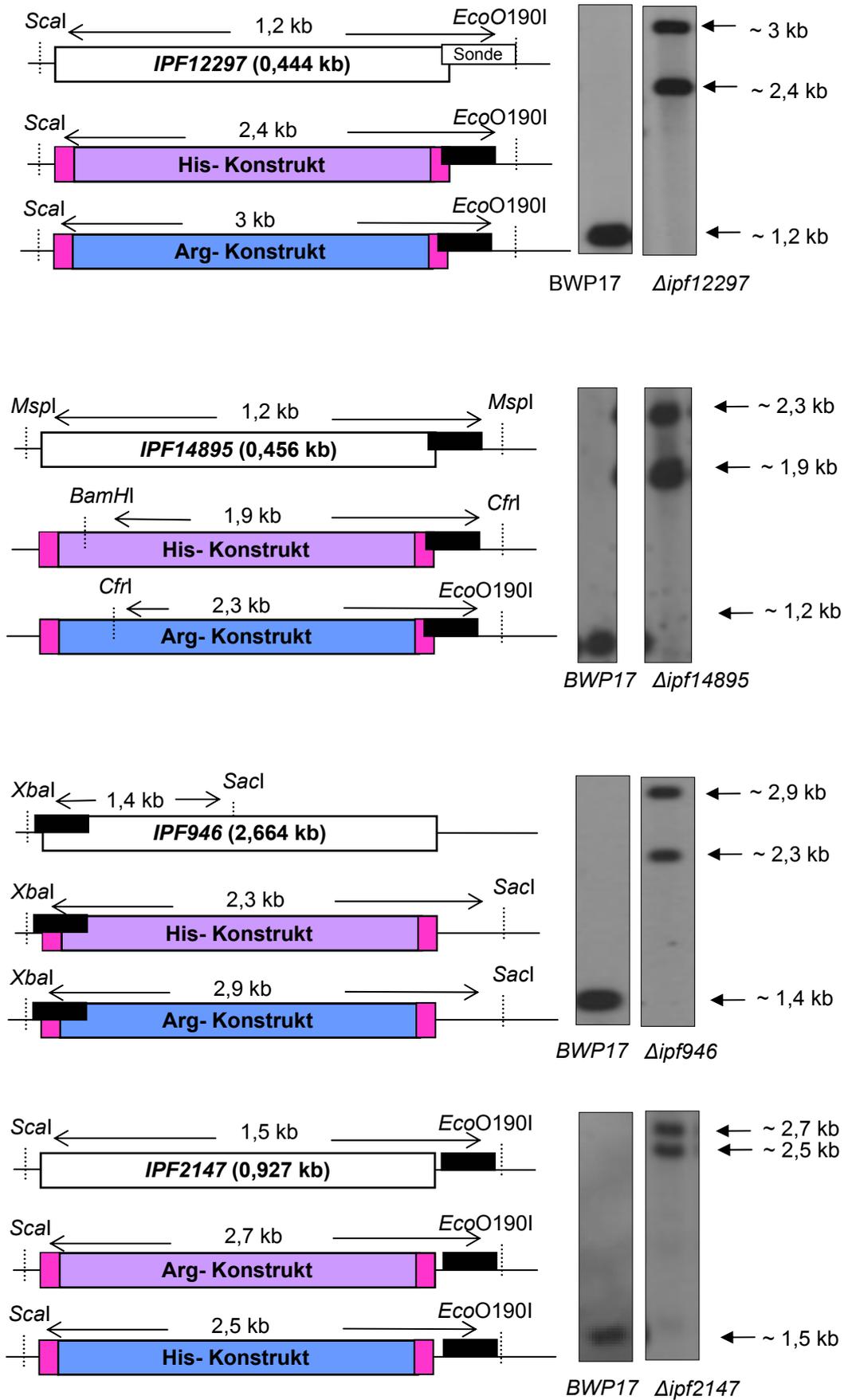
3.3 Charakterisierung potentiell infektionsassoziierter Gene

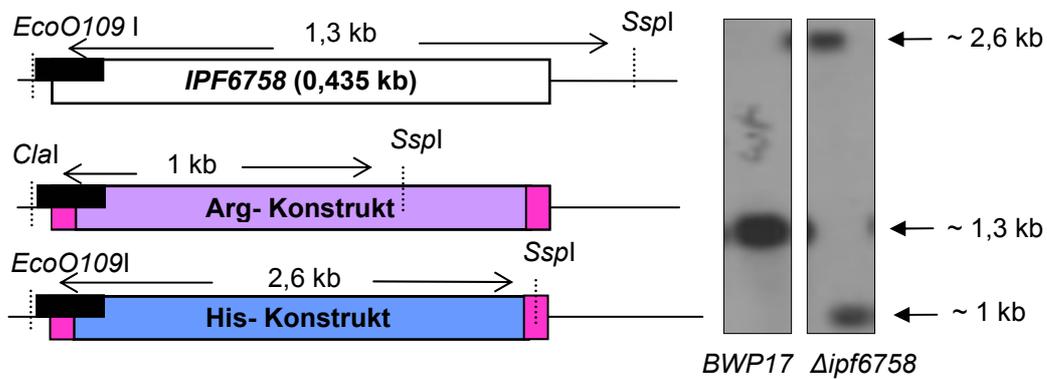
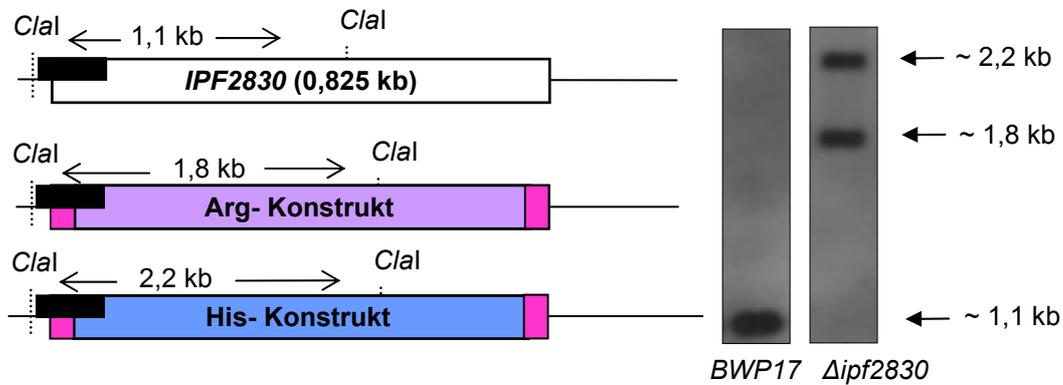
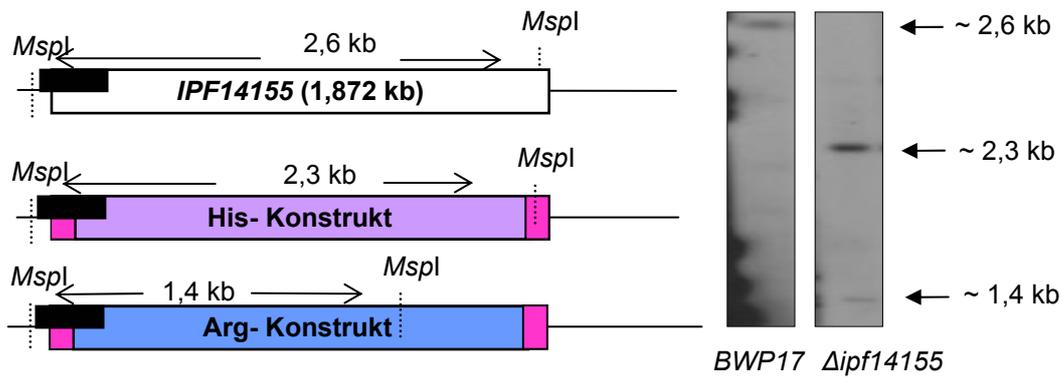
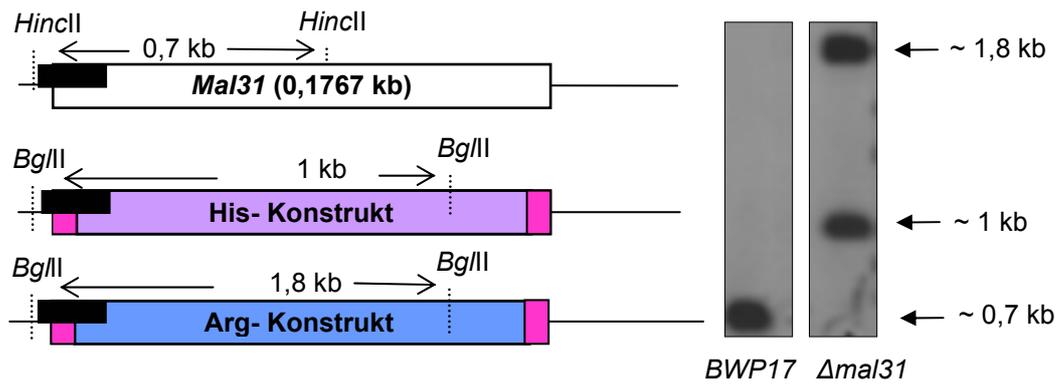
Ein Ziel der Analyse der Transkriptionsprofile war es, neue potentiell infektionsassoziierte Gene zu identifizieren. Dazu wurden 10 Gene anhand spezifischer Expressionskriterien ausgewählt und weiterführend analysiert. Zur Charakterisierung der Gene wurden Deletionsmutanten erstellt und diese in einem phänotypischen Screening auf mögliche Defekte *in vitro* untersucht. Eine der generierten Mutanten (*Δipf946*, *Δeed1*) zeigte einen besonders starken Phänotyp hinsichtlich der Fähigkeit, Hyphen bilden zu können sowie mit dem RHE-Gewebe zu interagieren. Diese Mutante wurde über einfach durchzuführende Analysen hinaus detailliert untersucht und weiterführend charakterisiert.

3.3.1 Erstellung von Deletionsmutanten

Die Herstellung der in dieser Arbeit generierten Deletionsmutanten erfolgte wie im Methodenteil beschrieben nach einer PCR-basierten Methode von Gola *et al.* (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.19.2). Die für die Deletion verwendeten genspezifischen Deletionsprimer sind unter Material und Methoden, Abschnitt 2.1.2, Tabelle 7 aufgelistet. Für jedes der ausgewählten Gene wurde eine spezifische Deletionskassette durch PCR generiert und in 2 aufeinanderfolgenden Deletionsschritten eine homozygote Mutante erstellt. Die Deletionskassetten für die jeweiligen Gene sind in Abbildung 21 dargestellt. Für die Gene *IPF946* (*EED1*), *IPF12297*, *IPF2147*, *IPF14155*, *IPF14895*, *IPF6758*, *IPF2830* und *MAL31* konnten Deletionsmutanten erstellt werden. Für die Gene *GTR1* und *IPF4126* war es auch unter Verwendung verschiedener Deletionskassetten nicht möglich Mutanten zu erstellen. Diese beiden Gene wurden daher in weiterführenden Analysen nicht berücksichtigt. Die jeweiligen Konstrukte sowie die im Southern Blot überprüften korrekten Insertionen sind in Abbildung 21 dargestellt.

Abbildung 21





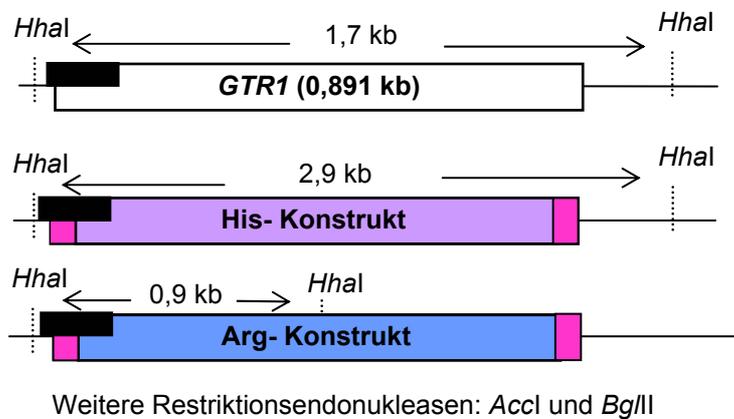
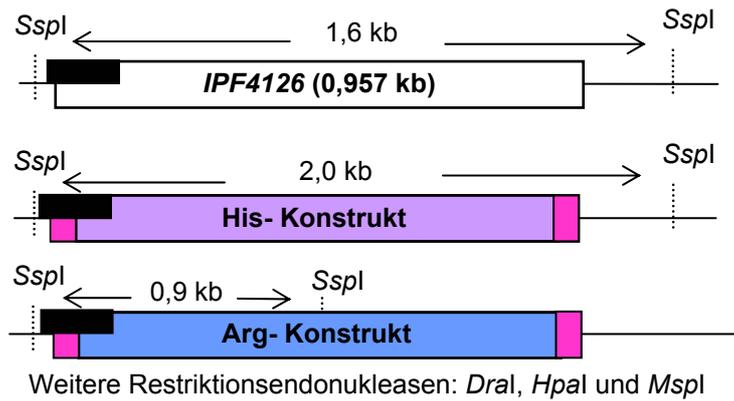


Abbildung 21. Graphische Darstellung der genspezifischen Deletionskassetten (schematisch) und der Southern Blot Analysen der ausgewählten Deletionsmutanten

Zur Konstruktion der Deletionskassetten wurden die Auxotrophiemarker (*HIS1* oder *ARG4*) mit genspezifischen Primern zu einer genspezifischen Deletionskassette mittels PCR amplifiziert und in den *C. albicans* Stamm BWP17 transformiert. Die korrekte Insertion der Kassetten wurde durch Southern Blot Analysen verifiziert. Dazu wurde die DNA der potentiellen Mutanten mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und die Lokalisation der Deletionskassetten anhand genspezifischer Sonden ermittelt. Als Kontrolle der Southern Blot Analyse wurden sowohl der *C. albicans* Stamm BWP 17 als auch dessen parentaler Stamm SC5314 verwendet. Da die Stämme in den Analysen identische Bandenmuster zeigten, ist in den Abbildungen nur ein Kontrollstamm dargestellt (linke Spur).

Für die Gene *GTR1* und *IPF4126* konnten keine Deletionsmutanten erstellt werden. Die Größen der Produkte sind in kb (Kilobasenpaare) angegeben. Die genspezifischen Sonden sind in der Abbildung als schwarzes Rechteck dargestellt, die flankierenden homologen Bereiche zu den spezifischen Genen in Pink.

3.3.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten

Um Aussagen über die möglichen Funktion der ausgeschalteten Gene treffen zu können wurden die Deletionsmutanten einem Virulenztest im RHE-Gewebemodell unterzogen und weiterführend in sogenannten Tropftestanalysen auf Wachstumsdefekte *in vitro* untersucht.

3.3.2.1 Virulenzscreening der Deletionsmutanten im RHE-Modell

Um zu überprüfen, ob die in den einzelnen Mutanten ausgeschalteten Gene einen Einfluss auf die Virulenz von *C. albicans* haben, wurden die Mutanten einem Virulenzscreening im epithelialen RHE-Gewebemodell unterzogen. Als Maß für die Virulenz der Stämme wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität bestimmt. Alle erstellten Deletionsmutanten wurden mit dem epithelialen Gewebe (RHE) über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigten vier der untersuchten Mutanten eine deutlich bis mäßig abgeschwächte Fähigkeit der Gewebszerstörung ($\Delta ipf946$, $\Delta ipf14895$, $\Delta ipf2147$ und $\Delta mal31$). Vier der Mutanten zeigten einem dem Wildtyp (*C. albicans* SC5314) und dem parentalen Stamm (*BWP17* + *Clp30*) entsprechende Fähigkeit der Gewebszerstörung.

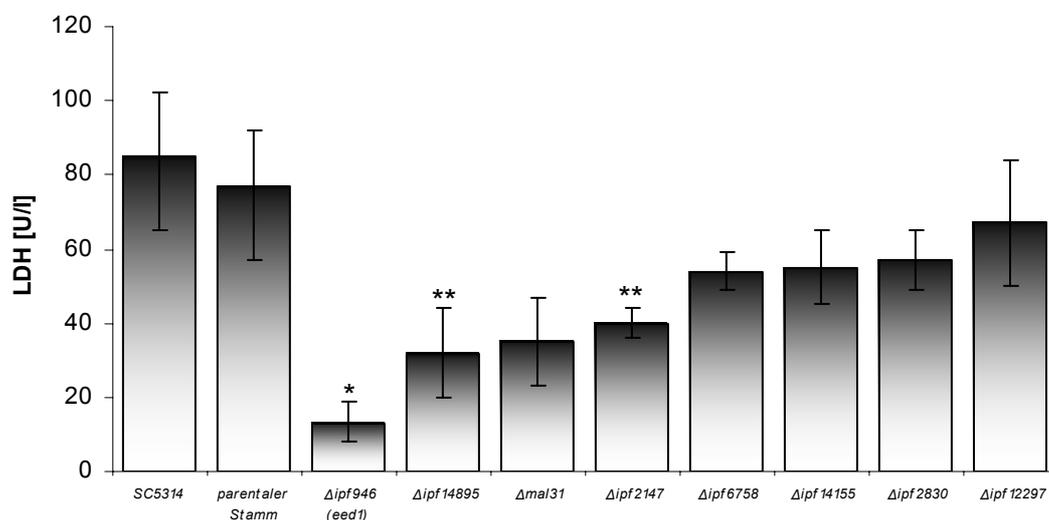


Abbildung 22. Virulenzanalyse der erstellten Deletionsmutanten im RHE-Modell

Als Marker für die verursachte Gewebszerstörung wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität bestimmt. Die Mutanten $\Delta ipf946$ (*eed1*), $\Delta ipf14895$, $\Delta mal31$ und $\Delta ipf2147$ zeigten eine attenuierte Fähigkeit der Gewebszerstörung, indiziert durch eine niedrige extrazelluläre LDH-Aktivität. Die Mutanten $\Delta ipf6758$, $\Delta ipf14155$, $\Delta ipf2830$ und $\Delta ipf12297$ verhielten sich im RHE Modell wie die Kontrollstämme (*C. albicans* SC5314 und parentaler Stamm).

*P < 0,0002 verglichen mit dem parentalen Stamm. **P < 0,02 verglichen mit dem parentalen Stamm.

3.3.2.2 Phänotypische Untersuchungen der Deletionsmutanten

Für die Untersuchung von Mutanten mit noch unbekanntem Phänotyp eignen sich Screeningmethoden, bei denen eine möglichst hohe Anzahl an Eigenschaften getestet werden kann. Dazu kann ein sogenannter Tropftest verwendet werden, bei dem die zu untersuchenden Stämme in verschiedenen Konzentrationen auf verschiedene Medien ausgetropft werden und das Wachstum im Vergleich zu einem Wildtyp oder parentalen Stamm beobachtet werden kann. Mit dieser Methode erfasste Phänotypen können erste Hinweise auf die Funktion des entsprechenden Gens geben.

Da es für die ausgewählten Gene keinerlei Hinweise auf mögliche Funktionen gab, wurden die Mutanten einem breiten Phänotypenscreening nach der Tropftest-Methode unterzogen. In Tabelle 4 sind die Medien und Chemikalien gelistet, die in den Tropftestuntersuchungen verwendet wurden.

Tabelle 4. Medien und Chemikalien die für die Tropftest-Analysen verwendet wurden

Funktion / Angriffspunkt	Medium
Normales Wachstum	SD, YPD (auch unter anaeroben und mikroaerophilen Bedingungen)
Hypheninduktion	Serum, Spider, Lee's, M199, RPMI + 10% Serum, GlucNac, Milch-Tween
Verwertung verschiedener Zucker (C-Quelle)	Mannose, Galaktose, Glycerin (auch unter anaeroben und mikroaerophilen Bedingungen)
Allgemeiner und spezieller Stress	pH 4,5-11, variierende Salz- und Metallkonzentrationen (z.B. Na ²⁺ , Li ²⁺ , Ca ²⁺) H ₂ O ₂ , verschiedenen Temperaturen (20-45°C), Sorbitol,
Zellwand / Zellmembran	Amorolfin, Amphoterin B, Calciflor, Kongo Rot, Flukonazol, , Itrakonazol, Mikonazol, SDS, Caspofungin, Nikkomycin Z
Proteinsynthese / -phosphorylierung	Hygromycin B, NaF, Koffein
Zytoskelett	Benomyl
DNA	UV-Licht, MMS (Methyl-Methansulfat)

Das Wachstum wurde für alle Medien und Chemikalien bei 30°C und 37°C untersucht. Weiterhin wurde für alle Mutanten das normale Wachstum in flüssigem Minimalmedium (SD) bestimmt sowie für einige Mutanten die

Adhärenzeigenschaften an humane Epithelzellen. Alle Untersuchungen der Mutanten wurden in Relation zu den Kontrollstämmen ausgewertet. Als Kontrollstämme wurden dabei der parentale Stamm der Mutanten (BWP17 + Clp30) sowie der Wildtypstamm (SC5314) verwendet.

3.3.2.2.1 Phänotypische Untersuchungen der Mutante *Δipf946* (*Δeed1*) (I)

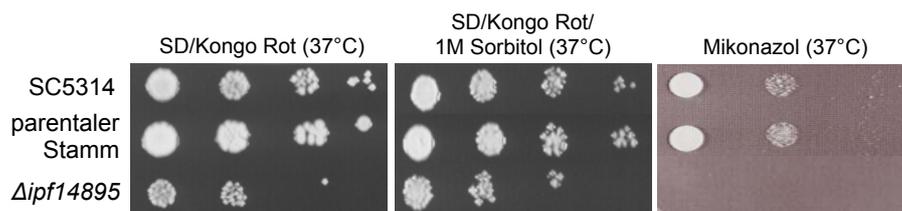
Die Deletion des Gens *IPF946* (*EED1*) führte zu einer nahezu avirulenten Mutante im RHE-Modell (Abbildung 22). Diese Mutante wurde daher über die Tropftestanalysen hinaus weiterführend analysiert und charakterisiert (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 3.4).

3.3.2.2.2 Phänotypische Untersuchungen der *Δipf14895* Mutante

IPF14895 wurde in den späten Phasen der experimentellen RHE-Infektion erhöht (>2-fach) exprimiert. *In silico* Analysen der Aminosäuresequenz zeigten außer einer CHCH-Domäne (coiled coil-helix) keine weiteren konservierten Motive oder Domänen, und auch in Blast Analysen konnten keine homologen Proteine in anderen Organismen identifiziert werden. Umfangreiche Tropftestanalysen zeigten, dass die Deletion des Gens *IPF14895* zu zellwandassoziierten Defekten in den *Δipf14895* Zellen führte. Chemikalien und Antimykotika, welche eine Auswirkung auf die Zellwand oder die Zellmembran ausübten, führten zu einer erhöhten Sensitivität der Mutante gegenüber den getesteten Substanzen im Vergleich zu den Kontrollstämmen. In Tabelle 5 sind die Substanzen gelistet, die bei der *Δipf14895* Mutante reduziertes Wachstum auslösten. Die *Δipf14895* Mutante zeigte weiterhin ein vermindertes Wachstum unter anaeroben Bedingungen sowie eine eingeschränkte Fähigkeit zur Chlamydosporenbildung. Das Wachstum der Mutante in flüssigem Minimalmedium (SD) war im Vergleich zum Wildtyp und dem parentalen Stamm leicht attenuiert, die Fähigkeit der RHE-Gewebescheidung deutlich reduziert (vgl. Abbildung 22). Weiterhin war die Fähigkeit der Chlamydosporenbildung in der Mutante im Vergleich zum parentalen Stamm attenuiert. In Abbildung 23 sind einige Phänotypen der *Δipf14895* Mutante dargestellt.

Tabelle 5. Medienzusätze welche bei der Analyse der *Δipf14895* Mutante zu einem verminderten Wachstum führten

Substanz		Auswirkung
Antimykotika	Amphotericin B	Bindung an Ergosterol in der Zellmembran
	Mikonazol	Blockade der Ergosterol Synthese
	Nikkomyzin Z	Störung der Zellwandbildung durch Hemmung der Chitin-Synthese
andere Stressfaktoren	Calcuflor	Chitin-bindender Farbstoff
	Kongo Rot	Zellwand-bindender Farbstoff
	SDS	Denaturierung der Proteine, Angriff der Zelloberfläche



Wachstum der *ipf14895* Mutante in SD-Medium (37°C)

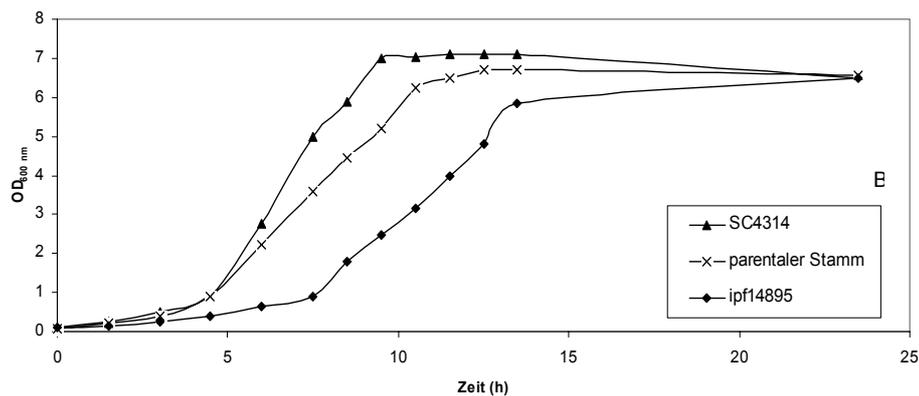


Abbildung 23. Wachstumsanalyse der *Δipf14895* Mutante

Die *Δipf14895* Mutante sowie der Wildtyp (SC5314) und ein parentaler Stamm wurden in Verdünnungsstufen auf den verschiedenen Festmedien ausgetropft. Die *Δipf14895* Mutante zeigte eine erhöhte Sensitivität gegen Kongo Rot (200 µg/ml) und Mikonazol (1,8 µg/ml). Die Zugabe von Sorbitol (zellwandstabilisierender Zuckeralkohol) führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Kongo Rot Toleranz. Das Wachstum in flüssigem SD Medium war in der Mutante leicht attenuiert.

3.3.2.2.3 Phänotypische Untersuchungen der Mutante *Δipf6758*

ORF IPF6758 wurde während der frühen Phase der experimentellen RHE Infektion auf erhöhtem Niveau (>2-fach) exprimiert. Die Deletion der beiden Allele dieses ORFs führte zu zellwandassoziierten Defekten. Sowohl das mit der Ergosterol-Synthese interferierende Antimykotikum Amorolfin als auch Mikonazol (Blockade der Ergosterol Synthese) und die Chemikalien SDS (Detergenz) und Hygromycin B (Inhibition der Proteinsynthese) wirkten sich negativ auf das Wachstum der Mutante aus. Das Wachstum der Mutante in definiertem Minimalmedium (SD) war ähnlich den Kontrollstämmen. Im RHE-Modell war die Mutante nicht abgeschwächt in der Fähigkeit Gewebeschädigungen hervorzurufen (vgl. Abbildung 22).

3.3.2.2.4 Phänotypische Untersuchungen der Mutanten *Δipf2147*, *Δipf12297*, *Δmal31*, *Δipf2830* und *Δipf14155*

Die Mutanten *Δipf2147* (*orf19.7194*), *Δipf12297* (*orf19.3117*), *Δmal31* (*orf19.3981*), *Δipf2830* (*orf19.7300*) und *Δipf14155* (*orf19.3373*) zeigten bei allen untersuchten Medien und Chemikalien keine eindeutigen Veränderungen im Wachstumsverhalten. Die Mutanten *Δmal31* und *Δipf2147* waren leicht attenuiert bezüglich ihrer Fähigkeit, Gewebeschädigungen im RHE-Gewebemodell hervorzurufen. Dieselben Mutanten zeigten im Vergleich zu den Kontrollstämmen jedoch keine erhöhten Sensitivitäten gegenüber den untersuchten Chemikalien oder Medien.

Die Mutante *Δipf12297* zeigte eine leicht erhöhte Sensitivität gegen Itrakonazol (Blockierung der Ergosterol-Synthese), verhielt sich im RHE-Gewebemodell jedoch weitestgehend wie die Kontrollstämmen. *In silico* Analysen der Aminosäuresequenz identifizierten ein CFEM-Motiv, eine cysteinreiche Domäne, welche auch in zellwandasoziierten Proteinen anderer Pilzspezies identifiziert werden konnte. Auch die Mutanten *Δipf2830* und *Δipf14155* verhielten sich im RHE-Gewebemodell wie die Kontrollstämmen und wuchsen in Anwesenheit der untersuchten Medien und Chemikalien normal. Das Wachstum in flüssigem Minimalmedium (SD) war in allen Mutanten entsprechend den Kontrollstämmen.

3.4 Charakterisierung der Mutante *Δipf946 (Δeed1)*

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Mutanten war die erstellte Deletionsmutante *Δipf946 (Δeed1)* nahezu avirulent im RHE-Gewebemodell (Abbildung 22). Die Mutante wurde daher über die Tropftestanalysen hinaus weiterführend analysiert und charakterisiert.

3.4.1 Expression von *IPF946 (EED1)*

Das Gen *IPF946 (orf19.7561)* wurde sowohl in den Patientenproben (>2-fach) als auch in der frühen Phase (>2-fach) und der späten Phase der RHE-Gewebeinfektion (hier jedoch nicht statistisch signifikant) auf hohem Niveau exprimiert (Abbildung 24). Auch in den unterstützenden Experimenten mit dem disruptiertem RHE war das mRNA-Niveau deutlich höher (>10-fach). Basierend auf der Annahme, dass dieses Gen nicht nur für die frühe Initiation der Infektion sondern auch für die Persistenz des Pilzes im Gewebe zuständig sein könnte (da sowohl in den frühen und späten Phasen der experimentellen Infektion, sowie in den Patientenproben stark exprimiert) sowie basierend aufgrund der im folgenden beschriebenen Phänotypen, wurde das Gen umbenannt in *EED1 (Epithelial Escape and Dissemination⁴)* und weiterführend analysiert.

⁴ *Epithelial Escape and Dissemination*, (engl): epitheliales Entkommen und Verbreitung / Ausbreitung im Gewebe

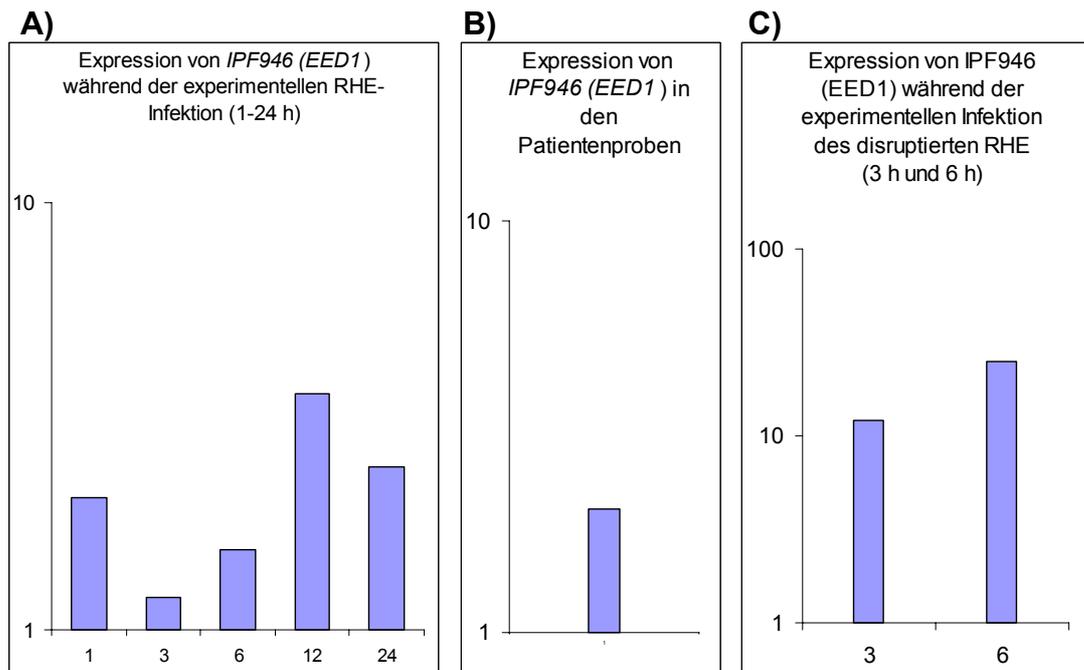


Abbildung 24. Expression von *EED1* in dem oralen Epithelmodell (RHE) und in den *in vivo* isolierten Patientenproben

Die Expression von *EED1* war über den zeitlichen Verlauf der experimentellen RHE Infektion während der frühen (1 h) und der späten Phase (12 h und 24 h) am stärksten (A). Auch in den Patientenproben (B) und in den Experimenten mit dem disruptierten RHE (C) zeigte sich eine starke und statistisch signifikante Expression von *EED1*. (Die normalisierte Genexpression ist auf der y-Achse aufgetragen, die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch dargestellt)

3.4.2 Erstellung der *EED1* Retransformationsstämme

Um den veränderten Phänotyp einer erstellten Deletionsmutante zweifellos auf die Deletion des entsprechenden Gens zurückführen zu können, muss die Reintegration des Gens in der jeweiligen Mutante zur Wiederherstellung des entsprechenden Wildtyp-Phänotyps führen („*Molecular Koch's Postulates*“) (Falkow, 1988). Das entsprechende Gen muss dabei nicht zwingend am Originallokus reintegriert werden. Für weiterführende Analysen der $\Delta eed1$ Mutante wurden daher *EED1*-Retransformationsstämme (Revertanten) generiert.

3.4.2.1 Konstruktion der Retransformationsplasmide und -stämme

Eine Standardmethode zur Erstellung von Retransformanten erfolgt über die Integration des jeweiligen Gens in den *RPS1* Locus mit Hilfe des *URA3* Selektionsmarkers. Das Rückgrat für die entsprechenden Retransformationsplasmide bildet dabei der Vektor Clp10, der neben dem *URA3* Gen auch eine *RPS1*-Sequenz enthält. Das Prozedere umfasst die Klonierung des entsprechenden Gens in den Vektor und die Integration des Vektors in den *RPS1* Genlocus des entsprechenden Mutantenstammes. Als Kontrolle kann dann die gleiche Mutante mit dem Clp10 Plasmid ohne zusätzliches Insert verwendet werden. Trotz vielfacher Klonierungsansätze/Transformationen ist es nicht gelungen *EED1* in den Clp10 Vektor zu klonieren, und es konnten keine Transformanten in verschiedenen *E. coli* Stämmen (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.1.1, Tabelle 2) generiert werden. Daher wurde eine modifizierte Strategie zur Wiederherstellung des Gens am Originalloкус verfolgt. Dazu wurde eine heterozygote Mutante H2 erstellt (*eed1Δ::URA3/EED1*) (vgl. Tabelle 6), bei welcher der *URA3*-Marker als Selektionsmarker verwendet wurde. In einem darauffolgenden Schritt wurde das Gen am Originalloкус wiederhergestellt, indem durch Rekombination der nativen *EED1* Sequenz (PCR Produkt) bei gleichzeitiger Selektion durch FOA der *URA3* Marker entfernt wurde (vgl. Tabelle 6). Alle Schritte der Deletion und Insertion wurden im Southern Blot überprüft. In Abbildung 25 ist die Southern Blot Analyse des Retransformantenstammes sowie des Wildtyps und der hetero- und homozygoten Mutanten dargestellt. Bei den heterozygoten Mutanten ist sowohl die heterozygote Mutante H1 (*eed1Δ::HIS1/EED1*) als auch die heterozygote Mutante H2 (*eed1Δ::URA3/EED1*), dem Zwischenschritt bei der Erstellung der Retransformante, dargestellt.

Die Aufhebung der Auxotrophien in den entsprechenden Stämmen wurde durch die Integration der Plasmide Clp10 oder Clp30 im *RPS1* Locus erreicht (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.12.9, Abbildung 4 und 5). Die Genotypen aller Stämme sind in Tabelle 6 zusammengefasst dargestellt.

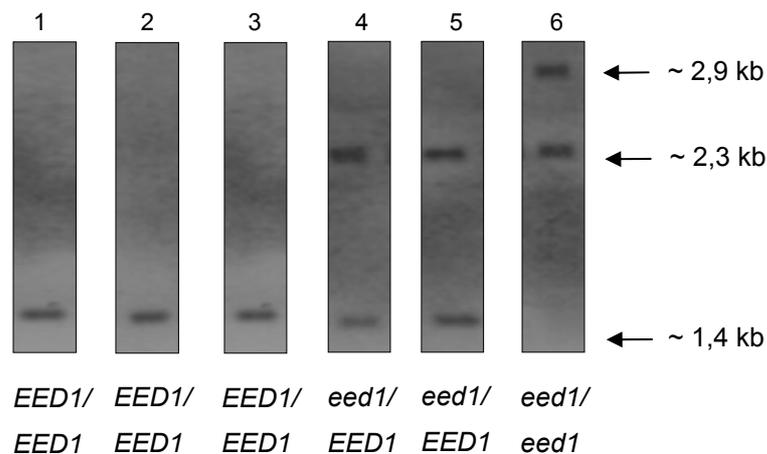


Abbildung 25. Southern Blot Analyse der Stämme mit *EED1* Deletion.

Für die Überprüfung der Gendelektionen und Reintegration von *EED1* wurde die genomische DNA der verschiedenen Stämme mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XbaI* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Über eine am *EED1* Genlokus bindende Sonde konnten Änderungen an diesem Lokus sichtbar gemacht werden. Die Fragmentgrößen des *SacI* / *XbaI* verdauten Wildtypalleles beträgt dabei 1,4 kb (Spur 1, Wildtyp SC5314, Spur 2, parentaler Stamm). Die Wildtypallele sind in der Retransformante wieder hergestellt (Spur 3). In den Spuren 4 und 5 sind die heterozygoten Mutantenstämme dargestellt. In Spur 4 ist die heterozygote Mutante H1 (*eed1Δ::HIS1/EED1*) und in Spur 5 die heterozygote Mutante H2 (*eed1Δ::URA3/EED1*) dargestellt. Die homozygote Mutante (*eed1Δ::HIS1/ eed1Δ::ARG4*) ist in Spur 6 der Southern Blot Analyse dargestellt.

Tabelle 6. Genotypen der Δ *eed1* Mutanten und der Retransformante

Stamm	Genotyp	Quelle
SC5314	Wildtyp	(Gillum et al., 1984)
BWP17	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434;</i> <i>his1::hisG/his1::hisG;arg4::hisG/arg4::HisG</i>	(Wilson et al., 1999)
parentaler Stamm	BWP17, Clp30	diese Arbeit
Δ <i>eed1</i> (<i>ipf946</i>)	BWP17, <i>eed1Δ::HIS1/eed1Δ::ARG4</i> , Clp10	diese Arbeit
Heterozygote (H1)	BWP17, <i>eed1Δ::HIS1/EED1</i> , Clp10	diese Arbeit
Heterozygote (H2)	BWP17, <i>eed1Δ::URA3/EED1</i> , Clp30	diese Arbeit
Retransformante	H2, <i>EED1/EED1</i> , Clp30	diese Arbeit

3.4.3 Die $\Delta eed1$ Mutante ist avirulent im RHE-Gewebemodell

Um zu untersuchen, ob die Reintegration von *EED1* zur Aufhebung des avirulenten Phänotyps der $\Delta eed1$ Mutante im RHE-Modell führt, wurde das RHE über einen Zeitraum von 24 h mit der $\Delta eed1$ Mutante sowie der Retransformante infiziert und die extrazelluläre LDH-Aktivität als Maß für die Zerstörung des Gewebes quantifiziert. Wie in Abbildung 26 dargestellt, zeigte die Retransformante ein dem Wildtyp und dem parentalen Stamm (PS) entsprechendes Maß an Gewebeerzörung. Ebenfalls dargestellt ist die Gewebeerzörung durch die heterozygoten Mutantenstämme H1 und H2. Bereits die Disruption eines Allels von *EED1* verursachte eine signifikante Abschwächung der Gewebeerzörung.

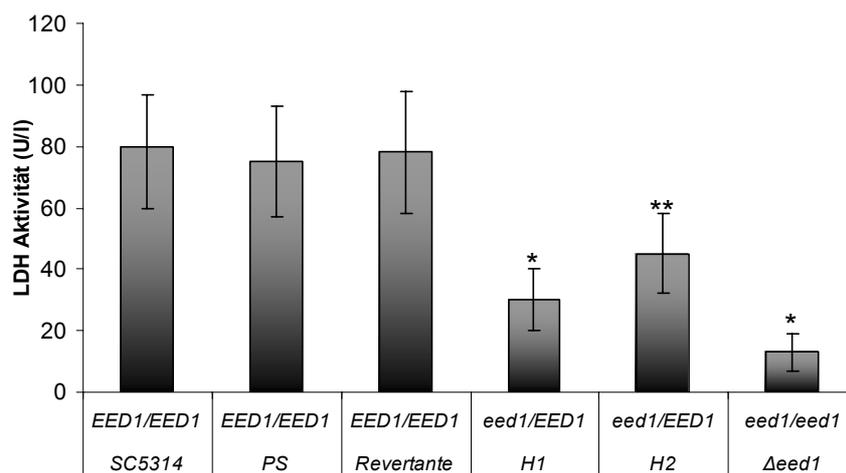


Abbildung 26. Extrazelluläre LDH-Aktivität nach Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante und der Retransformante mit dem oralen Epithelgewebe (RHE) (24 h)

Die extrazelluläre LDH-Aktivität wurde als Maß für die Zerstörung des epithelialen Gewebes bestimmt. (PS = parentaler Stamm)

*P <0,0002 verglichen mit dem parentalen Stamm. **P <0,008 verglichen mit dem parentalen Stamm.

3.4.4 Charakterisierung der $\Delta eed1$ Mutante *in vitro*

Um Hinweise auf die Funktion von *EED1* zu erlangen wurde die $\Delta eed1$ Mutante *in vitro*, basierend auf Tropftest- und morphologischen Analysen, weiterführend untersucht. Alle durchgeführten Experimente wurden mit dem Wildtyp (SC5314) der Retransformante sowie des parentalen Stammes als Kontrollen durchgeführt.

3.4.4.1 Morphologie und Wachstum der $\Delta eed1$ Mutante in flüssigem Kulturmedium

In Übernachtskulturen (>12 h) in flüssigen Minimal- oder Vollmedium (SD oder YPD) waren die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante morphologisch nicht von denen der Kontrollstämme (Wildtyp parentaler Stamm und Retransformante) zu unterscheiden. Das Wachstumsverhalten der $\Delta eed1$ Mutante stellte sich im Vergleich zu den Kontrollstämmen als gering verlangsamt dar (Abbildung 27). Nach 24 h wurde jedoch von allen Stämmen eine vergleichbare End-OD₆₀₀ erreicht.

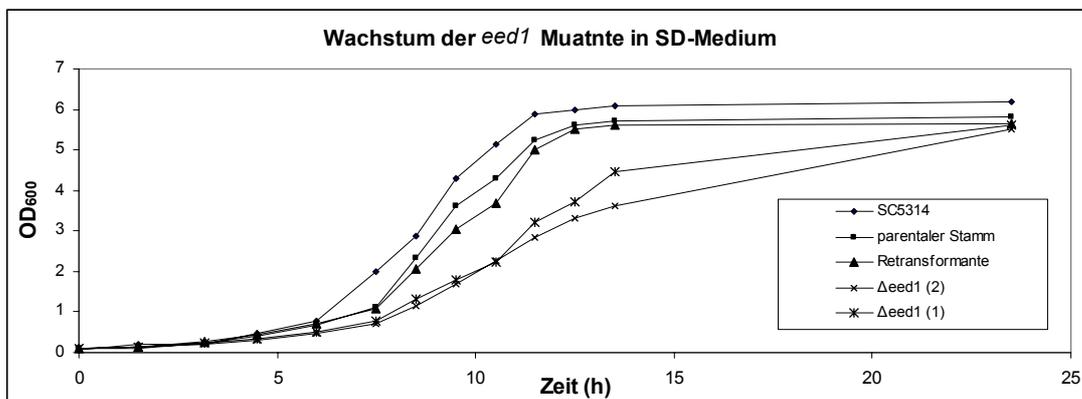


Abbildung 27. Wachstum der $\Delta eed1$ Mutante in SD Medium

Das Wachstum der $\Delta eed1$ Mutante in SD Medium wurde über 24 h verfolgt. Nach 24 h wurden von allen Stämmen eine vergleichbare OD₆₀₀ erreicht. Für den Wachstumsversuch wurden zwei isogene $\Delta eed1$ Mutanten sowie die Kontrollstämme (Wildtyp, parentaler Stamm und Retransformante) getestet.

3.4.4.2 Morphologische Anomalien der $\Delta eed1$ Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen (Fest- und Flüssigmedien)

Anhand der bereits beschriebenen Tropftest-Analysen wurde die Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante mit verschiedenen Medien untersucht. Die $\Delta eed1$ Mutante zeigte dabei einen deutlich veränderten Phänotyp auf Medien, die das Hyphenwachstum in *C. albicans* induzierten. Unter keiner der getesteten, hypheninduzierenden Bedingungen (Milch-Tween Agar, M199-Medium, 10% Serum, N-Acetylglucosamin- (*GlucNac*) und Spidermedium) konnte die $\Delta eed1$ Mutante Hyphen bilden (Abbildung 28). Der Kontrollstamm Wildtyp, der parentale Stamm sowie die Retransformante zeigten unter allen getesteten Bedingungen ein normales Hyphenwachstum. Auch in über Nacht inkubierten Flüssigkulturen waren die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen nicht elongiert. Nach >12 h Inkubation in 10% Serum lagen 100% der $\Delta eed1$ Zellen in der oval-rundlichen Hefeform vor (Abbildung 28, B). In den heterozygoten Mutanten ($\Delta eed1/EED1$) war die Fähigkeit der Hyphenbildung ebenfalls stark attenuiert (Abbildung 28, B). Alle anderen, im Tropftest-Screening untersuchte Medien und Chemikalien, hatten keinen Einfluss auf das Wachstum der $\Delta eed1$ Mutante.

3.4.4.3 $\Delta eed1$ Zellen können keine Chlamydosporen bilden

Bei den Chlamydosporen handelt es sich um eine dickwandige, asexuelle sporenähnliche Form, welche von Hyphenzellen abstammt (Martin *et al.*, 2005). Die Rolle der Chlamydosporen bei der Pathogenese von *C. albicans* ist noch unbekannt. Um zu untersuchen, ob die $\Delta eed1$ Mutante dazu in der Lage ist, in dieser sporenähnlichen Zellform zu wachsen, wurde das Wachstum unter Bedingungen untersucht, die in Wildtypstämmen Chlamydosporenbildung induzieren. Wie in Abbildung 29 dargestellt, war die $\Delta eed1$ Mutante, im Gegensatz zu den Kontrollstämmen (Wildtyp und parentaler Stamm) (A), nicht mehr dazu in der Lage, Chlamydosporen zu bilden (C). Die heterozygoten Stämme ($\Delta eed1/EED1$) zeigten eine attenuierte Chlamydosporenbildung (Abbildung 29, B). Diese Ergebnisse deuten an, dass *EED1* auch bei der Chlamydosporenbildung eine wichtige Rolle spielt.

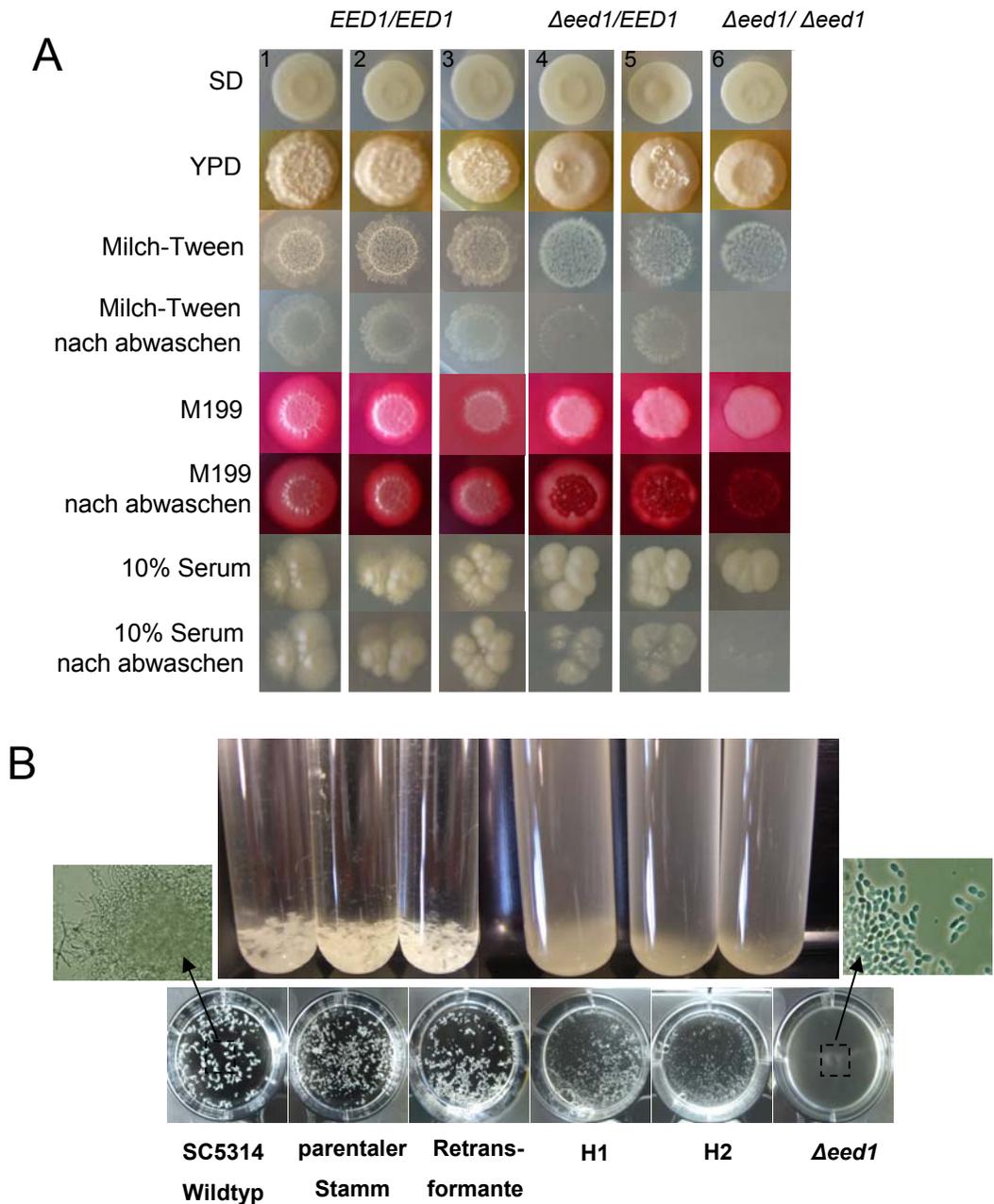


Abbildung 28. Untersuchungen zur Zellmorphologie der *Δeed1* Mutante
 (A) Tropftestanalyse der *Δeed1* Mutante. Die Stämme (Wildtyp (1), parentaler Stamm (2), Retransformante (3), heterozygote H1 und H2 (4,5) und *Δeed1* Mutante (6)) wurden dazu auf hypheninduzierenden Medien ausgetropft. Im Gegensatz zu den Kontrollstämmen zeigte die *Δeed1* Mutante kein Hyphenwachstum. Dies äußerte sich durch die fehlende laterale, sternförmige „Ausfransung“ der Kolonien, bedingt durch ein filamentöses Wachstum der Zellen. Ferner ließen sich die invasiv in den Agar gewachsenen Hyphenzellen deutlich schlechter abwaschen als die oberflächlichen Hefenzellen. B) In Übernachtskulturen unter hypheninduzierenden Bedingungen wuchsen die Kontrollstämmen, im Gegensatz zu der *Δeed1* Mutante, in der filamentösen Hyphenform, die zur Aggregation neigt.

3.4.4.4 Defekte Zellelongation der $\Delta eed1$ Mutante (*Quorum sensing*-Protokoll)

Als *Quorum sensing* wird die Fähigkeit der Kommunikation und Koordination zwischen Mikroorganismen bezeichnet. Dabei werden sogenannte QSMs (*quorum sensing molecules*) zur Kommunikation verwendet. Auch für *C. albicans* wurden solche *Quorum sensing* Phänomene beschrieben. So beeinflusst zum Beispiel die Größe des Inokulums die Morphologie von *C. albicans*. Dabei wird vermutet, dass Farnesol das entsprechende negative QSM ist, welches die Hyphenbildung bei hohen Zelldichten (z.B. stationäre Wachstumsphase) verhindert (Hornby *et al.*, 2001). Dem entgegengesetzt verkürzt das QSM Tyrosol die Latenz-Phase und unterstützt die Hyphenbildung bei niedrigen Zelldichten (Chen *et al.*, 2004). Da die Hyphenbildung durch verschiedene induzierende Medien in der $\Delta eed1$ Mutante einen eindeutigen Defekt aufweist, wurde die Hyphenbildung durch *Quorum sensing* Effekte untersucht. Dazu wurde eine stationär gewachsene YPD-Kultur in frisches, vorgewärmtes YPD-Medium verdünnt. Dies führte in Wildtypzellen zu einer transienten Hypheninduktion, die bis zu 3 h stabil war (Enjalbert and Whiteway, 2005).

Während die Kontrollstämme (Wildtyp und parentaler Stamm) sowie der Retransformationsstamm eine transiente Hyphenbildung zeigten (>98% der Zellen nach 3 h), konnten für die $\Delta eed1$ Zellen zu keinem Zeitpunkt elongierte Hyphenzellen beobachtet werden (Abbildung 30).

Auch die Zugabe von cAMP oder von verschiedenen Konzentrationen Tyrosol induzierten zu keinem Zeitpunkt das Hyphenwachstum in der $\Delta eed1$ Mutante. Die Verstärkung des Stimulus durch Durchführung des *Quorum Sensing* Protokolls in 10-100% Serum führte ebenfalls zu keiner Hypheninduktion.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich durch den Stimulus der Zelldichte und *Quorum sensing* Kommunikation bei der $\Delta eed1$ Mutante kein Hyphenwachstum induzieren lässt. Auch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Tyrosol führte zu keiner Aufhebung des Phänotyps. Dies impliziert, dass es sich bei dem Defekt der $\Delta eed1$ Mutante um einen zentralen Defekt in der Hyphenbildung handelt, da unter keiner der untersuchten Bedingungen *in vitro* die Hyphenbildung induziert werden konnte.

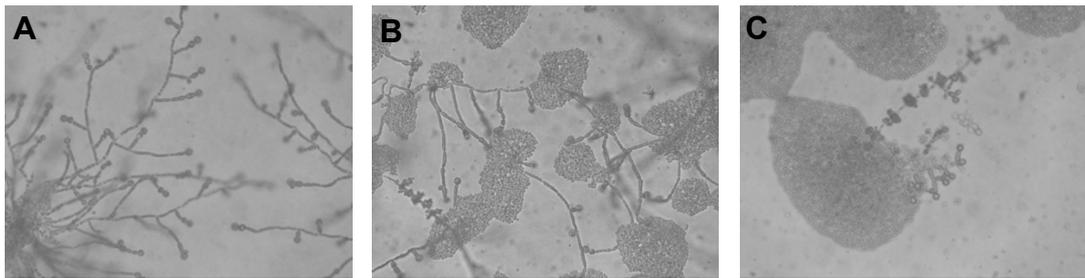


Abbildung 29. Reduzierte Chlamydosporenbildung der $\Delta eed1$ Mutante

Die Abbildung zeigt die Chlamydosporenbildung in der $\Delta eed1$ Mutante. Im Gegensatz zu dem parental Stamm (A) war die $\Delta eed1$ Mutante (C) nicht dazu in der Lage, Chlamydosporen zu bilden. Die heterozygote Mutante H1 zeigte eine attenuierte Chlamydosporenbildung (B).

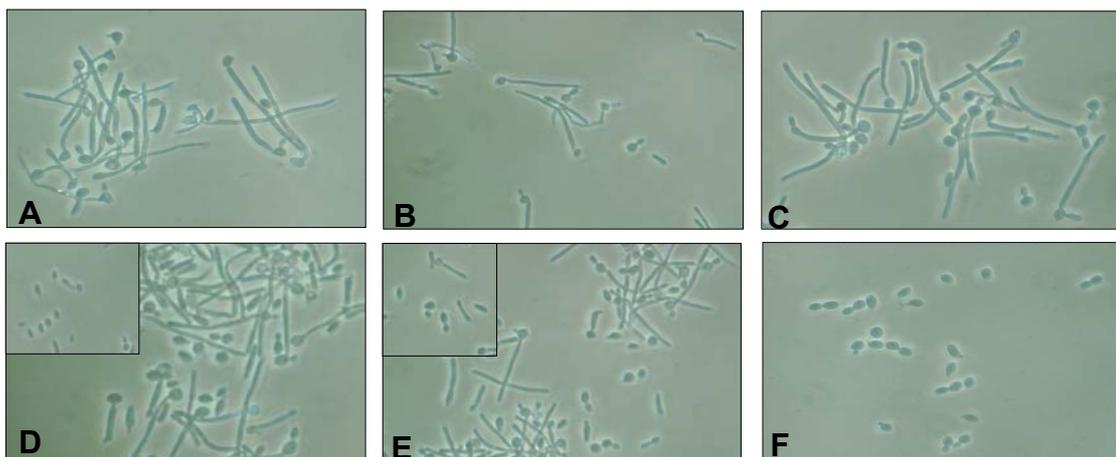


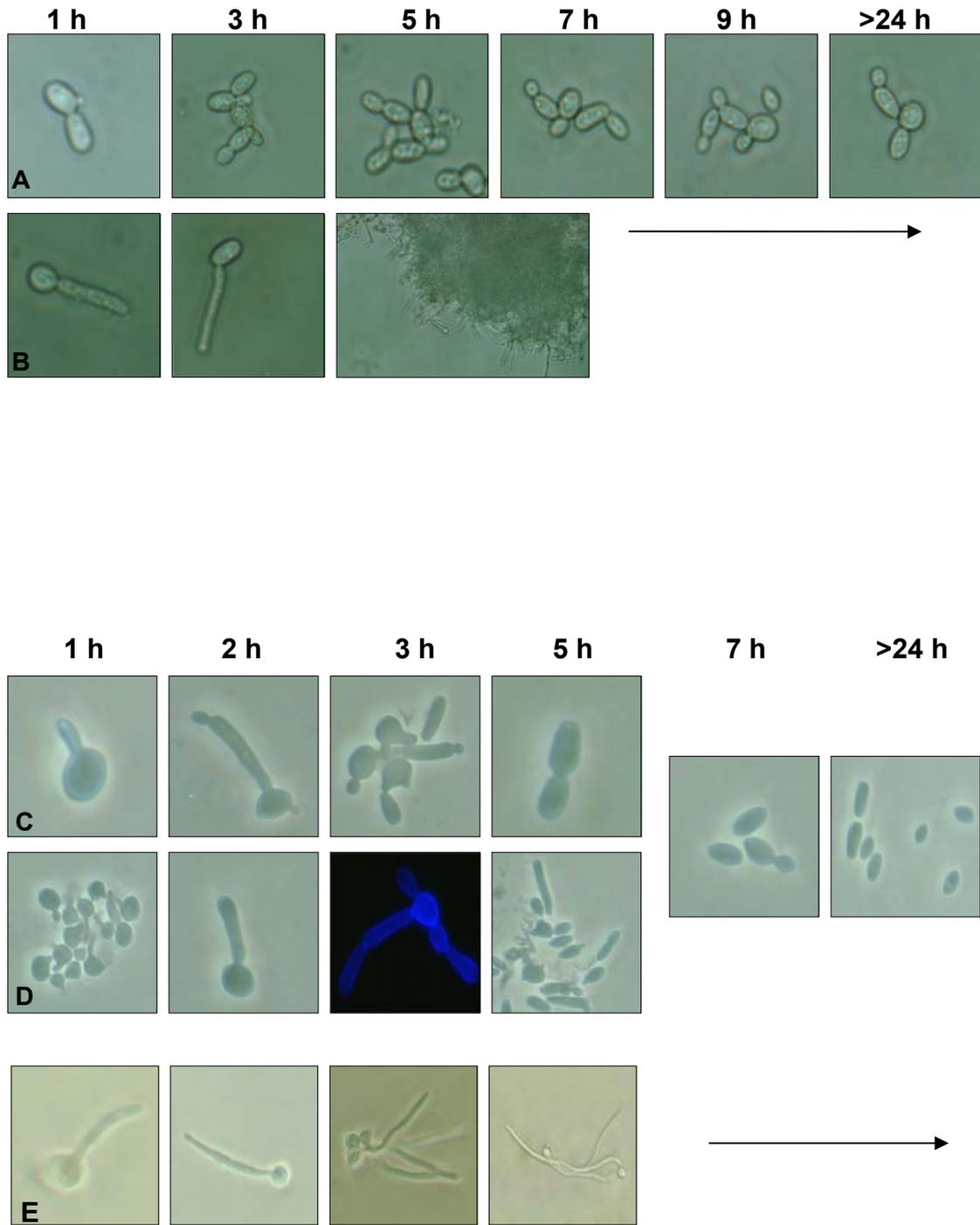
Abbildung 30. Untersuchung der Zellelongation durch *Quorum sensing* Effekte bei der $\Delta eed1$ Mutante

Die Abbildung zeigt die transiente Hyphenbildung, induziert durch die Verdünnung einer Übernachtskultur in frisches, 37°C warmes Medium (YPD). Nach 3 h lagen die Zellen der Kontrollstämme in der elongierten Hyphenform vor (Wildtyp (A), parentaler Stamm (B), Retransformante (C)). Die heterozygoten $\Delta eed1$ Mutanten H1 und H2 (D, E) zeigten eine verminderte Fähigkeit der Hyphenbildung. Die homozygote $\Delta eed1$ Mutante (F) zeigte zu keinem Zeitpunkt ein elongiertes Hyphenwachstum.

3.4.4.5 Untersuchung der Zellelongation in der $\Delta eed1$ Mutante (Kombinierte Induktionsprotokolle)

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass *EED1* für das Wachstum in der elongierten Hyphenmorphologie eine wichtige Rolle spielt. Um zu untersuchen, ob *EED1* für eine spezielle Phase der Myzelinduktion oder -elongation (Verlängerung) relevant ist, wurden verschiedene Medien mit $\Delta eed1$ Zellen beimpft und über einen längeren Zeitraum (bis 24 h) stündlich mikroskopisch analysiert. Dabei wurden neben verschiedenen Medien auch verschiedenen Zellkonzentrationen untersucht. In Übernachtskulturen unter hypheninduzierenden Bedingungen (10% Serum in H₂O) konnte bereits in vorhergehenden Experimenten keine Hypheninduktion für die $\Delta eed1$ Zellen beobachtet werden (Abbildung 28, B). Um das Wachstum der $\Delta eed1$ Zellen zu beobachten, wurde eine gesättigte Übernachtskultur (SD-Medium) 1:10 in 10% Serum (in H₂O) verdünnt. Auch die stündliche Untersuchung dieser Proben zeigte zu keinem Zeitpunkt elongierte $\Delta eed1$ Zellen. (Abbildung 31, A). Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollstämme eine unmittelbare Induktion des Hyphenwachstums (Abbildung 31, B). Andere untersuchte Medien, wie z.B. RPMI1640 + 10% Serum oder M199-Medium, führten dagegen, bei einer gleichzeitigen Verringerung der Zellzahl ($<10^7$ Zellen/ml), zu einer transienten Elongation der $\Delta eed1$ Zellen (Abbildung 31, C und D): lediglich unmittelbar nach Überführung der Zellen in die frischen Medien (1 h–3 h) wurden elongierte Zellen nachgewiesen. Die Elongationen der Mutante waren dabei im Vergleich zu den Kontrollstämmen deutlich verkürzt (Abbildung 31, F). Nach längerer Inkubation (>4 h) konnten kaum noch elongierte $\Delta eed1$ Zellen beobachtet werden. In Übernachtskulturen (>24 h) lagen ausschließlich Hefezellen und kurzkettinge Pseudohyphen vor. Im Vergleich zu den Kontrollstämmen fand bei deutlich weniger $\Delta eed1$ Zellen eine Elongation statt (Abbildung 31, G).

Die Analyse des Elongationsverhaltens der $\Delta eed1$ Mutante zeigte, dass eine transiente Elongation *in vitro* möglich ist. Dabei scheint die Stärke und/oder die Art des Stimulus eine wichtige Rolle zu spielen. Die Elongation der $\Delta eed1$ Zellen unterscheidet sich daher von den Kontrollstämmen in drei Punkten: (1) durch die zeitliche Begrenzung (keine stabile Elongation über 4 h), (2) durch die Länge der Elongation (kürzere Elongationen) und (3) durch eine geringere Anzahl an Zellen,



(Abbildung 31)

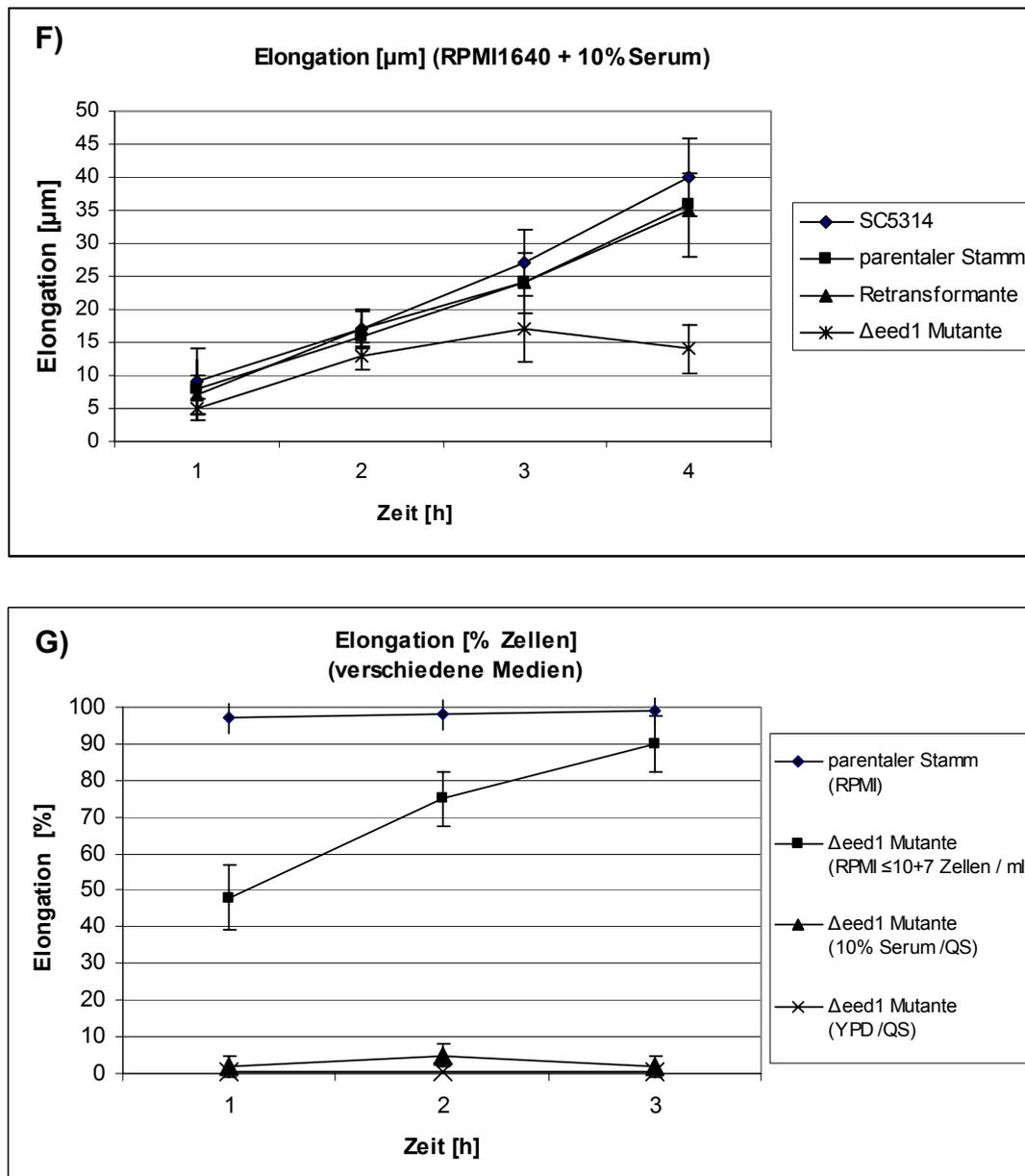


Abbildung 31. Zellelongationen der Δeed1 Zellen bei kombinierten Induktionsprotokollen

Unter einigen hypheninduzierenden Bedingungen (z.B. 10% Serum in Wasser) zeigen die Zellen der Δeed1 Mutante zu keinem Zeitpunkt elongierte Zellen (A), im Gegensatz zu den Zellen des parentalen Kontrollstammes (B). Wurde eine verringerte Zellzahl der Δeed1 Mutante in RPMI1640+ 10% Serum (C) oder M199 Medium (D) inkubiert, konnte eine transiente Elongation der Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zum parental Stamm (E) zeigten jedoch deutlich weniger Zellen eine Elongation (G). Darüber hinaus waren elongierte Δeed1 Zellen deutlich kürzer (F). Nach einer Inkubationszeit von 5 h konnten für die Mutante keine elongierten Zellen mehr beobachtet werden (C und D).

die Elongation ausbildeten. Weiterhin unterschieden sich die Morphologien der Elongationen des Wildtyps und der $\Delta eed1$ Zellen: die Hyphen der Kontrollstämme waren mit einer Breite von 1,5-2 μm deutlich schmaler als die Elongationen der $\Delta eed1$ Zellen (2-4 μm).

3.4.4.6 $\Delta eed1$ Zellen zeigen ein defektes invasives Wachstum

Die Möglichkeit, in der elongierten Hyphenform zu wachsen, ist eine wichtige Voraussetzung, um *C. albicans* ein invasives Wachstum zu ermöglichen. Da die $\Delta eed1$ Mutante in den durchgeführten Experimenten einen eindeutigen Defekt in der Hyphenbildung zeigte, wurden die invasiven Fähigkeiten der $\Delta eed1$ Mutante untersucht. Wie in Abbildung 32 dargestellt, war die $\Delta eed1$ Mutante nicht mehr in der Lage, unter aeroben oder semiaeroben Bedingungen auf Agarplatten invasiv zu wachsen (Abbildung 32, B, E und G). Die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante lagen ausschließlich in der Hefeform vor und penetrierten unter keiner der getesteten Bedingungen in den Agar. Im Gegensatz dazu bildeten die Kontrollstämme Hyphen und wuchsen invasiv (Abbildung 32, A und C).

Der Defekt in der Fähigkeit, invasiv wachsen zu können, hatte sich bereits in den Tropftestanalysen (Abbildung 28) angedeutet. Während sich die ausgetropften Zellen der Kontrollstämme, bedingt durch die in den Agar eingewachsenen Hyphenzellen, nur schwer von den Agaroberflächen abwaschen ließen, wurden die nicht invasiven Hefezellen der $\Delta eed1$ Mutante leicht von der Oberfläche abgewaschen.

cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) ist ein wichtiges, regulatorisch aktives Molekül in Prokaryoten und Eukaryoten. In *C. albicans* wird der Hefe/Myzel Übergang durch mehrere Signalwege reguliert, wobei cAMP in einem der Signalwege eine wichtige Rolle spielt (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.4.1.1, Regulation des Dimorphismus). Cdc35p, eine Adenylatzyklase, ist essentiell für den Hefe/Myzel Übergang und die Virulenz von *C. albicans* (Harcus et al., 2004). Die $\Delta cdc35$ Mutante ist nicht mehr dazu in der Lage in der elongierten Hyphenform zu wachsen: dieser Defekt kann jedoch durch Zugabe von cAMP (und db cAMP⁵) aufgehoben werden (Abbildung 32, I und J). Um zu testen, ob der veränderte

⁵ dbcAMP (Dibutyl cAMP): membrangängiges cAMP Analogon

Phänotyp der *Δeed1* Mutante auf ein zu niedriges cAMP Niveau ausgelöst wird und Eed1p möglicherweise eine Komponente des cAMP-Signalweges darstellt, wurde das Hyphenwachstum der *Δeed1* Mutante unter Zugabe von cAMP untersucht. In keiner der untersuchten Bedingungen (Invasion in Serumagar, YPS) konnte die Zugabe von cAMP das Hyphenwachstum in der *Δeed1* Mutante wieder herstellen (Abbildung 32, G und H).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die in der *Δeed1* Mutante verminderte Fähigkeit des invasiven Wachstums mit der verminderten Fähigkeit der Hyphenbildung korreliert. Die Fähigkeit des invasiven Wachstums ließ sich auch durch die Zugabe von cAMP nicht wiederherstellen, was andeutet, dass Eed1p keine Komponente des cAMP Signalweges darstellt.

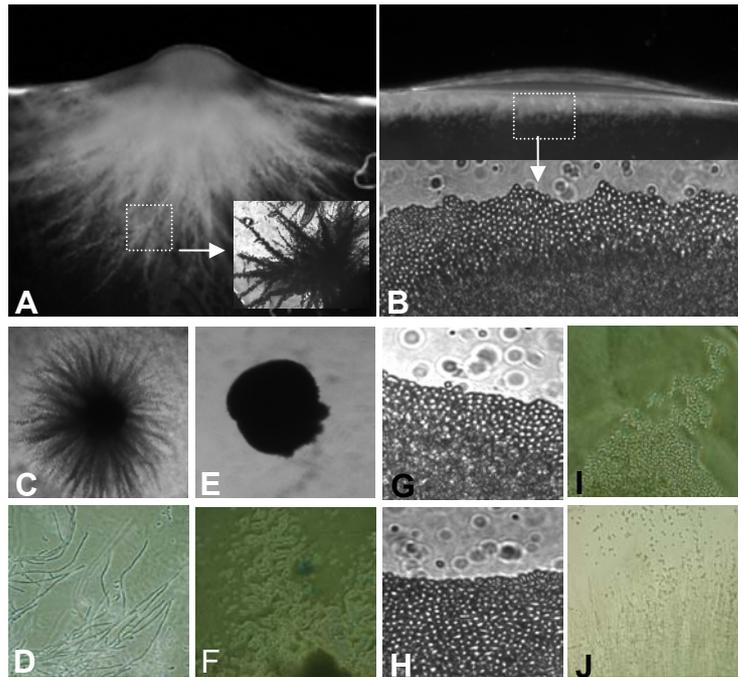


Abbildung 32. Untersuchung zur abgeschwächten Invasivität der $\Delta eed1$ Mutante *in vitro*

Um das invasive Wachstum zu untersuchen wurden die *EED1* assoziierten Stämme auf verschiedenen Testmedien bei 37°C inkubiert und die Zellen mikroskopisch analysiert. Abbildung A zeigt die Interaktion der Wildtypzellen mit Serumagar: die Hyphenzellen (kleines Bild) wuchsen in den Serumagar hinein und breiteten sich invasiv aus. Im Gegensatz dazu lagen die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante als Hefezellen in den oberflächennahen Bereichen des Serumagars vor (B). Auch eingebettet in Matrix (YPS) zeigte die $\Delta eed1$ Mutante (E, F) keine Hyphenbildung oder invasives Wachstum. Die Kontrollstämme lagen als Hyphenzellen vor und wuchsen invasiv in den Agar, was zu den charakteristischen, sternförmigen Kolonien führte (C, D). Die $\Delta cdc35$ Mutante zeigte einen Defekt in der Hyphenbildung (I). Dieser Phänotyp konnte jedoch durch Zugabe von cAMP aufgehoben werden (J). Der Phänotyp der $\Delta eed1$ Mutante (G) ließ sich dagegen durch Zugabe von cAMP nicht aufheben (H).

3.4.5 Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante mit Epithelzellen und -gewebe

In den beschriebenen, in vitro durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zellen der $\Delta eed1$ Mutante nur geringe invasive Fähigkeiten hatten. Eine, wenn auch nur transiente, Elongation der $\Delta eed1$ Zellen konnte nur unter Einwirkung bestimmter, kombinierter Stimuli beobachtet werden. Im RHE-Gewebemodell, einem Infektionsmodell zur Untersuchung der Pathogenität von *C. albicans* Stämmen, zeigte die $\Delta eed1$ Mutante einen nahezu avirulenten Phänotyp. Um die Vorgänge bei der Interaktion mit Wirtsgewebe näher zu analysieren, wurden orale TR146 Epithelzellen mit der $\Delta eed1$ Mutante infiziert und die Interaktionen licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

3.4.5.1 Transiente Elongation der $\Delta eed1$ Zellen bei Interaktionen mit oralen TR146 Epithelzellen

Hinsichtlich der eingeschränkten Fähigkeit, Hyphen zu bilden, wurden die Interaktionen der $\Delta eed1$ Mutante mit einer oralen Epithelzelllinie (TR146) untersucht. Dazu wurden die Epithelzellen mit der $\Delta eed1$ Mutante infiziert und nach 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 9 h und 24 h mikroskopisch analysiert. Zur Analyse der Interaktion wurden die *C. albicans* Zellen immunhistologisch sequentiell angefärbt. Wie in Abbildung 33, A dargestellt, fand auch bei der Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante mit Epithelzellen eine transiente Elongation der Zellen statt, die, anders als in den Flüssigkulturen, bis zu 7 h stabil war. In den frühen Zeitpunkten der Interaktionen konnte eine dem parentalen Stamm entsprechende Interaktion und Elongation der $\Delta eed1$ Zellen beobachtet werden. Dabei zeigten die $\Delta eed1$ Zellen auch invasives Wachstum in die Epithelzellen (Abbildung 33, A, 3 h-7 h). Über den Zeitpunkt von 7 h hinaus waren jedoch nur noch vereinzelt elongierte $\Delta eed1$ Zellen in Interaktion mit den Epithelzellen zu beobachten. Im Gegensatz dazu war die Oberfläche der mit dem parentalen Stamm infizierten Epithelzellen bereits von einem dichten Myzelgeflecht bedeckt (Abbildung 33, B, 9 h).

Nach 24 h lagen die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante ausschließlich als Hefezellen oder kurzkettinge Pseudohyphen vor, die hauptsächlich intra- oder interzellulär lokalisiert waren (Abbildung 33, A, 24 h).

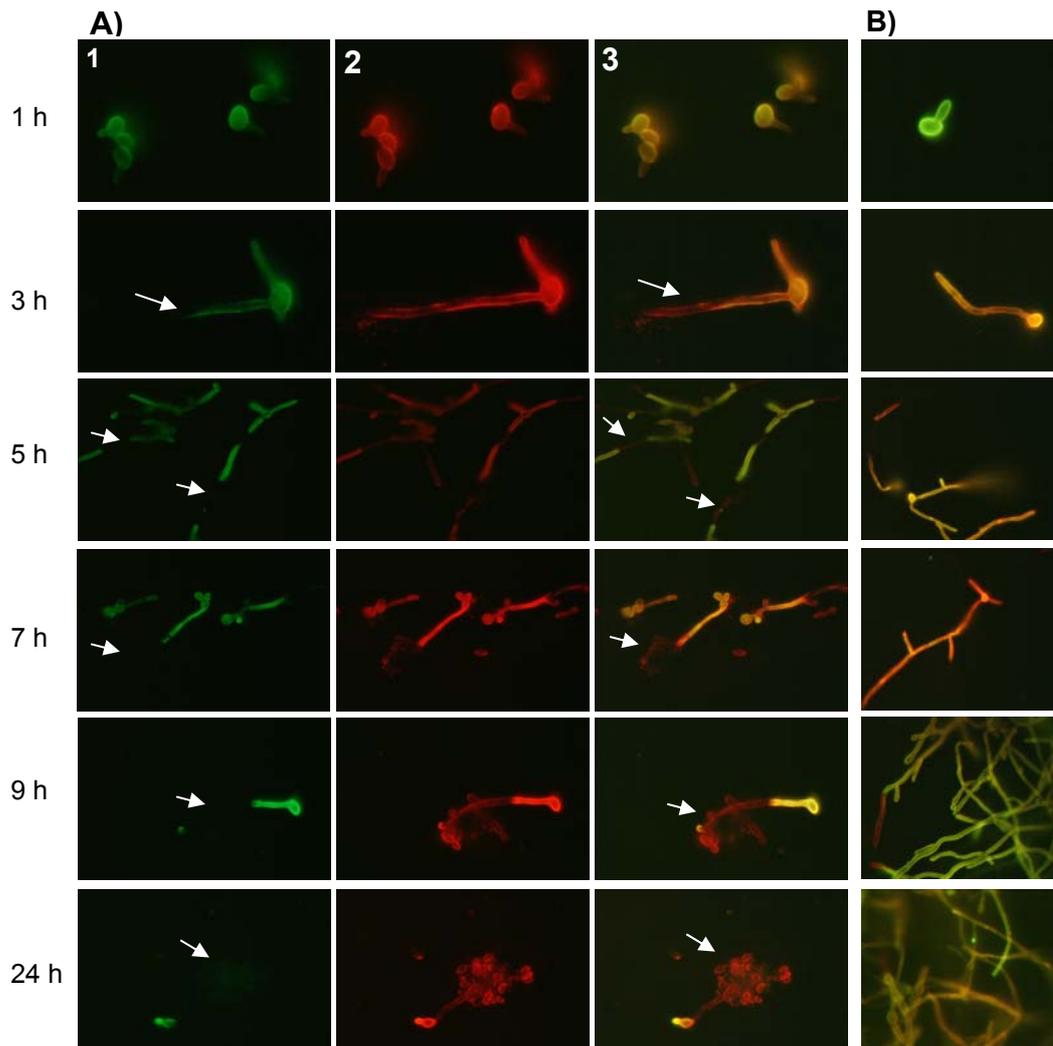


Abbildung 33. Transiente Elongation der $\Delta eed1$ Zellen bei Interaktion mit oralen TR146 Epithelzellen

Die Abbildung zeigt die Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante (A) und des parental Stammes (B) mit den oralen Epithelzellen über einen Zeitraum von 24 h. Für die Analyse der Interaktion wurden die *C. albicans* Zellen immunhistologisch angefärbt.

Dazu wurden die adhärenenten *C. albicans* Zellen mit einem Antikörper (konjugiert mit Alexa Fluor 488) grün markiert (1). Die Epithelzellen wurden anschließend permeabilisiert und die *C. albicans* Zellen mit einem zweiten Antikörper (konjugiert mit Alexa Fluor 568) rot markiert (2). In diesem Schritt wurden auch die in die Epithelzellen penetrierten Bereiche der Pilzzelle markiert. In der Überlagerung der Bilder (3) sind die extrazellulären Bereiche der Pilzzelle gelb, die intrazellulären Bereiche rot markiert. Für den parental Stamm (B) ist nur die Überlagerung der Bilder dargestellt. Intrazelluläre Pilzzellen (in rot) sind durch Pfeile markiert.

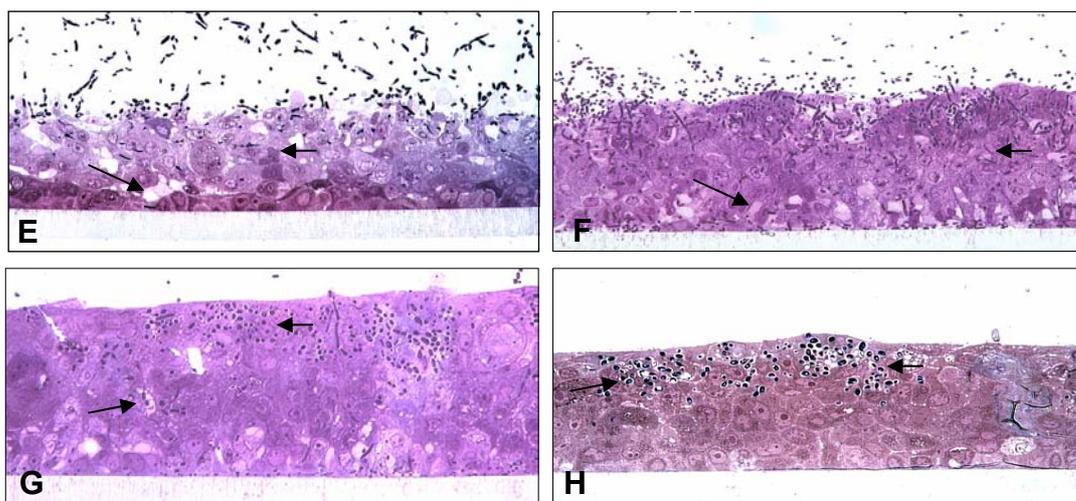
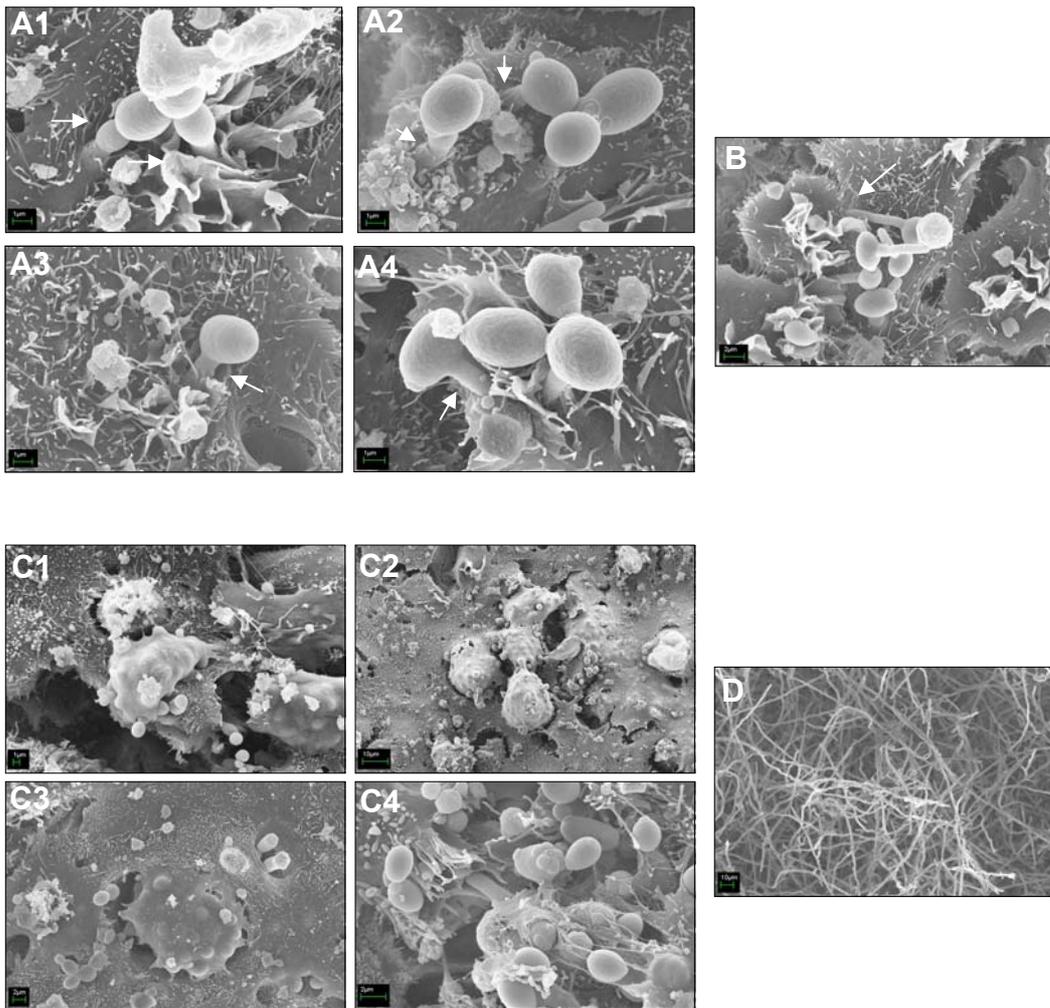
Die Hyphenbildung, Elongation und Penetration der *Δeed1* Mutante war in den frühen Zeitpunkten (1 h-5 h) der Interaktion mit den oralen Epithelzellen kaum von denen des parentalen Stammes zu unterscheiden. Eine stabile Elongation der Zellen über die frühen Zeitpunkte hinaus war jedoch auch bei der Interaktion mit Epithelzellen nicht zu beobachten. In den späten Zeitpunkten der Interaktion (>9 h) zeigten die *Δeed1* Zellen, ähnlich wie auch schon in Flüssigkultur beobachtet, ein Wachstum als Hefezellen oder als kurzgekettige Pseudohyphen.

Die mikroskopische Analyse der Interaktion der Epithelzellen mit der *Δeed1* Mutante impliziert, dass die Epithelzellen einen starken Stimulus für die Induktion des Hyphenwachstums in der *Δeed1* Mutante darstellen. *EED1* scheint bei einer frühen Interaktion mit einem starken Stimulus eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies wird auch durch ein den Kontrollstämmen entsprechendes Adhäsionsverhalten der *Δeed1* Mutante an orale Epithelzellen untermauert. Für eine stabile Hyphenbildung scheint *EED1* jedoch eine essentielle Rolle zu spielen, da auch bei Interaktion mit Epithelzellen die Elongation der Zellen nur transient zu beobachten war.

3.4.5.2 Mikroskopische Analyse der Interaktion der *Δeed1* Mutante mit dem RHE-Gewebemodell

Um die Interaktion der *Δeed1* Mutante mit epithelialen Strukturen weiterführend zu untersuchen, wurde das orale RHE-Gewebemodell mit der *Δeed1* Mutante infiziert und mikroskopisch analysiert. Dazu wurden die Gewebeprobe für 1 h und 24 h mit der *Δeed1* Mutante oder dem parentalen Stamm infiziert und sowohl lichtmikroskopisch als auch raster- (REM) und transmissions-elektronenmikroskopisch (TEM) analysiert.

In der frühen Phase (1 h) der Infektion waren die Zellen der *Δeed1* Mutante von denen des parentalen Stammes morphologisch kaum zu unterscheiden. Wie schon in Abschnitt 3.1.1 (Interaktion mit Epithelgewebe), beschrieben, war die frühe Phase der Infektion durch eine unmittelbare Induktion der elongierten Hyphenform gekennzeichnet. Dies wurde sowohl für den parentalen Stamm (Abbildung 34, B) als auch für die Zellen der *Δeed1* (Abbildung 34, A1-4) Mutanten beobachtet. Auch die strukturellen Änderungen der epithelialen Oberfläche



(Abbildung 34)

Abbildung 34. Mikroskopische Darstellung der Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante mit dem epithelialen Gewebemodell (RHE)

Die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante (A) waren in den frühen Phasen der Infektion (1 h) kaum von denen des parental Stammes (B) zu unterscheiden. Die elongierten Zellen der $\Delta eed1$ Mutante interagierten mit dem Gewebe, wie es auch für die Zellen der Kontrollstämme gezeigt werden konnte (A1-4 und Abbildung 2). Nach 24 h experimenteller Infektion lagen die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante als Hefezellen vor, beschränkt auf die oberflächennahen Bereiche des Gewebes (C1-4). Die Zellen des parental Stammes interagierten als elongierte Hyphenzellen mit dem Epithelgewebe (D). Die lokale Beschränkung der Mutante auf oberflächliche Gewebestrukturen spiegelte sich auch deutlich in den histologischen Schnitten der späten Phase der Infektion wieder (24 h). Während die Hyphenzellen des parental Stammes (E) und der Retransformante (F) invasiv in tiefere Gewebeschichten wuchsen (Pfeile in E und F), lagen die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante vornehmlich in oberflächennahen Bereichen, lokal begrenzt, vor (Pfeile in H). Die Zellen des heterozygoten Stammes H1 (G) wuchsen in einer seminvasiven Mischform (Pfeile in G).

(*membrane ruffling*, induzierte Endozytose) waren für beide Stämme zu beobachten. Nach 24 h der experimentellen Infektion war das mit dem parental Stamm infizierte Gewebe von einem dichten Myzelgeflecht bedeckt (Abbildung 34, D). Der Pilz war in das Gewebe penetriert und zeigte ein invasives Wachstum in der elongierten Hyphenform. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante kein invasives Wachstum. Nach 24 h experimenteller Infektion befanden sich die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante hauptsächlich in oberflächennahen Abschnitten des Gewebes. Beulenartige Strukturen waren sowohl in den histologischen Schnitten als auch in den REM Aufnahmen zu sehen und deuteten auf eine intrazelluläre Vermehrung hin (Abbildung 34, C1-4, G und H). Elongierte Hyphenzellen waren nicht auf der Oberfläche zu beobachten. Abgesehen von den beulenartigen Strukturen in den oberflächlichen Bereichen des Gewebes, waren vereinzelt Hefezellen oder kurzketziges Pseudomyzel auf der Oberfläche zu sehen. Wie auch schon die Analyse der Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante mit den oralen Epithelzellen gezeigt hatte, waren die Elongationen der $\Delta eed1$ Zellen nicht über einen längeren Zeitpunkt stabil. Die transiente Hyphenbildung führte, wie in den Abbildungen 34, G und H dargestellt, zu einer verminderten Invasivität im Vergleich zu dem parental Stamm. Die Ausbreitung der $\Delta eed1$ Zellen blieb auf einen oberflächlichen Bereich des Gewebes beschränkt und die Proliferation der Zellen fand zu späteren Zeitpunkten ausschließlich in der Hefeform und lokal beschränkt statt.

Auch in den transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen der späten Phase (24 h) der RHE-Infektion spiegelt sich die lokale Begrenzung der $\Delta eed1$ Zellen wieder (Abbildung 35).

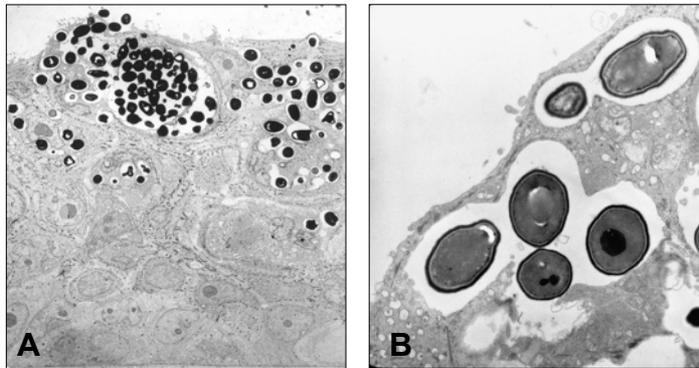


Abbildung 35. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen der Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante mit dem RHE (24 h)

In den Abbildungen (A) und (B) ist die lokal begrenzte Ausbreitung der $\Delta eed1$ Zellen im epithelialen Gewebe nach 24 h dargestellt. Auch in diesen Aufnahmen ist eine intrazelluläre Vermehrung sichtbar.

3.4.6 *In silico* Analysen der Aminosäuresequenz von Eed1p

Um weitere Hinweise auf die Funktion des Genprodukts von *EED1* zu erhalten, wurde die Aminosäuresequenz des Proteins Eed1p in *C. albicans* *in silico* analysiert.

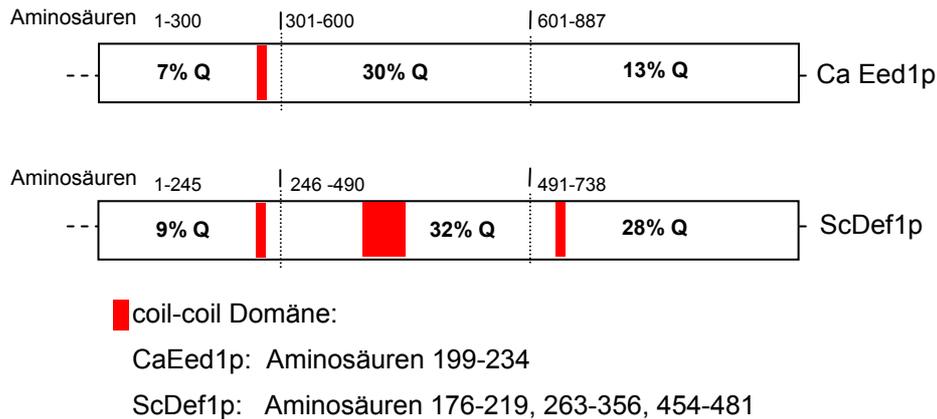
3.4.6.1 Sequenzhomologien von Eed1p zu Def1p in *S. cerevisiae*

Für das Protein Eed1p aus *C. albicans* konnte in *S. cerevisiae* ein Protein mit geringfügigen Homologien, aber größeren strukturellen Ähnlichkeiten identifiziert werden (ScDef1p). Beide Proteine waren gekennzeichnet durch einen ungewöhnlich hohen Glutamin Anteil in der Aminosäuresequenz: 16% der Aminosäuren in CaEed1p werden durch Glutamin repräsentiert, in ScDef1p sind es 23% (Abbildung 36, B). Abgesehen von einigen repetitiven Sequenzen sowie einer coil-coil Domäne konnten in Eed1p keine funktionellen Domänen oder Motive identifiziert werden, die Hinweise auf eine eventuelle Funktion oder Lokalisation geben könnten (Abbildung 36, A). Weiterführende Blast-Analysen der gesamten Aminosäuresequenz ergaben keine relevanten Ergebnisse (z.B. E-Value >0,035, Score < 40). Blast Analysen des mittleren, glutaminreichen Abschnittes identifizierten Proteine, die zu einem sehr großen Teil DNA assoziierte Funktionen hatten. Neben chromatinassoziierten (Proteine aus *Neurospora crassa* oder *Debaryomyces hansenii*) und transkriptionsassoziierten Proteinen (*S. cerevisiae*) wurden auch humane Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren mit Zinkfingermotiven, RNA Polymerase II assoziierte Proteine) und pflanzliche Proteine (Gliadine, z.B. aus Weizen) aufgezeigt. Anhand der durchgeführten *in silico* Analysen konnten für Eed1p keine weiteren Hinweise auf mögliche Funktionen des Proteins gewonnen werden.

A)

MERRQFNT**SNIRN**GTGRPRKTPRSKLYMVYPPPLSGEDSTNPEPEEGSSQE
 NNPTPESSSQSNSVQNQDQSEDQSQLP**QQESNTQQESNTQQESNT**PSPR
 ASNTSTETPAPLSPIQPGIRNIPSGLLLPQEKVGRLMGYPFYRDFNFTLNPE
 RYQKLIYVFQILKNAARNHRNGASLLRKYFSLARRSKRTTDMFVTTIEEMRK
 RSLNSRKRELEEAQEREESNKROHT**ESSAEPNAE**SSTESTTESNA**ESGA**
EPNAEPSAESTTESNV**ESGAEPNA**ESGA**ESGAEPNAE**SNAELKQRIWEILS
 YRLEQSNNETNNTGESNSTSQPRQLPNNELIMNIRVLQKNTHAKPVLGRI
 KFTPKSNKTSLTGSGQNKVHSTNTQQSQKHPQQILTNSETHKPQQYSAQS
 QQQMVHQTNSEPSQKRSPPPQQQQQKQPSVPTSSVPLQVSQKQNNQQQ
 QELPLPPQPQPQQRTAPSAVKQQQSMQMPPPPQQQQQQQRHQPLQQS
 PPTMPLQQQPVPVQVQTVPPPSSQPQTQLSQQQQQQQQQAQLQMQVP
 RCYQYQNRPSQQQRQYSQTPQYNQPPPQQ**KVYALPPQQVYA**PPPR**QVY**
AQPTIACKQQYPQQLYEQAPQEGSSYQHHYQQVQQRQNNQQPYMQSAPT
 YQQPHVQTPKSTRSNKQEKQRLPKGQEQVPKATRMTMFEAFTGSNIAVEKL
 RQRTLDNGREPERLRTEYVNVLSSPERAAEKSTSRSKQSSNQKPVVKQQS
 SFPPPIKHQQTQEQQGNILPPVSQLLAIQSSTVTSRGSNASGAVMGSNTQ
 RVASRSFTNTFVAEAVVNNANNRGGVPPTGPETNTRGGRASTRSSGRP
 RGNRSTQRAEGNVTGRVARSTDGSQSQNSGKASKI**SNIRN**LLN

B)

**Abbildung 36. *In silico* Sequenzanalysen von Def1p und Eed1p**

A) Aminosäuresequenz des Eed1p Proteins von *C. albicans*. Die Aminosäure Glutamin (Q) stellt einen ungewöhnlich hohen Anteil in der Sequenz dar.

B) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen der Proteine CaEed1p und ScDef1p. Die Ähnlichkeit der Proteine basiert auf einem hohen Anteil der Aminosäure Glutamin in den Proteinen. Neben den identifizierten coil-coil Domänen (dargestellt in rot) konnten für beide Proteine durch *in silico* Analysen keine weiteren Motive identifiziert werden.

3.4.6.2 Untersuchung der $\Delta eed1$ Mutante auf $Sc\Delta def1$ assoziierte Phänotypen

Das Protein Def1p in *S. cerevisiae* wurde charakterisiert als eine Komponente der RNA-Polymerase II (RNAPII), welche im Falle einer irreparablen Schädigung des zu transkribierenden DNA-Stranges für die Degradierung der RNAPII verantwortlich ist (Woudstra *et al.*, 2002). Die Degradierung der RNAPII wird dabei durch eine von Def1p aktivierten Ubiquitylierung eingeleitet. (Somesh *et al.*, 2005). Weiterhin wurde Def1p als RNAPII abhängiger Elongationsfaktor sowie als telomerassoziierter Faktor beschrieben (Chen *et al.*, 2005). Die Deletion von *DEF1* in *S. cerevisiae* führte zu verlangsamtem Wachstum, verminderter UV-Sensitivität, instabiler mitochondrialer DNA sowie verkürzten Telomeren (Chen *et al.*, 2005; Somesh *et al.*, 2005; Reid and Svejstrup, 2004). Um zu untersuchen, ob Eed1p und Def1p auf zellulärer Ebene funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen, wurde die $\Delta eed1$ Mutante auf verminderte nukleäre und mitochondriale DNA- Stabilität sowie DNA-assoziierte Reparations-Mechanismen untersucht. Dazu wurden Tropftestanalysen verwendet (Abbildung 37). Um die Stabilität der nukleären DNA zu untersuchen, wurden die Tropftestanalysen mit Methyl-Methansulfat- (MMS) sowie unter Bestrahlung mit UV-Licht durchgeführt. Sowohl MMS als auch die Bestrahlung mit UV-Licht haben mutagenisierende Effekte und führen zu Strangbrüchen in der DNA. Bei Tropftest-Analysen mit verschiedenen Konzentrationen MMS (bis 0,03%) sowie einer UV-Bestrahlung bis 90J m^{-2} , konnten keine Unterschiede zwischen der $\Delta eed1$ Mutante und den Kontrollstämmen festgestellt werden (Abbildung 37). Zur Untersuchung der Integrität der mitochondrialen DNA wurden die $\Delta eed1$ Zellen auf Glyzerin als Kohlenstoffquelle ausgetropft. Hefezellen mit Defekten in den Mitochondrien können nicht auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Kontrollstämmen und der $\Delta eed1$ Mutante festgestellt werden. Mit den hier untersuchten Medien und Chemikalien konnten keine übereinstimmenden Phänotypen mit der $Sc\Delta def1$ Mutante identifiziert werden (Abbildung 37).

Die Untersuchungen legen eine intakte nukleäre und mitochondriale DNA-Stabilität sowie ein intaktes DNA-Reparatursystem in der $\Delta eed1$ Mutante nahe.

Um gesicherte Aussagen über die zelluläre Funktion von Eed1p treffen zu können, müssten jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden.

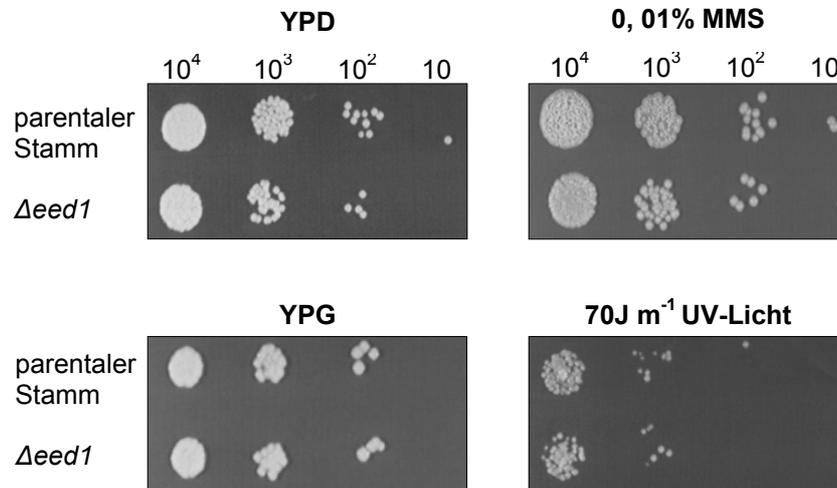


Abbildung 37. ScDEF1 assoziierte Phänotypen der $\Delta eed1$ Mutante

In der Abbildung sind die Tropftestanalysen auf den untersuchten Medien dargestellt. Die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante und des parentalen Stammes wurden dazu auf den verschiedenen Medien ausgetropft und für 1-5 Tage bei 37°C inkubiert. Die mit UV-Licht bestrahlten Zellen wurden auf YPD Medium ausgetropft, bestrahlt und dann bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es konnten keine signifikanten Phänotypen auf den untersuchten Medien beobachtet werden. Die Kontrollstämme (Wildtyp und parentaler Stamm, sowie Retransformante) zeigten kein unterschiedliches Wachstum, daher ist in der Abbildung nur der parentale Stamm (BWP17 + Clp 30) dargestellt.

(YPG: Glycerin als Kohlenstoffquelle, MMS: Methyl-Methansulfat).

Als Wachstumskontrolle wurden die Zellen auf YPD ausgetropft und unbehandelt inkubiert.

3.4.7 Analyse der Transkriptionsprofile der $\Delta eed1$ Mutante während der experimentellen RHE Infektion

Die Analyse der $\Delta eed1$ Mutante zeigte, dass sich die Deletion des Gens *EED1* in *C. albicans* signifikant auf die Fähigkeit der Hyphenbildung auswirkte. Die $\Delta eed1$ Mutante zeigte Defekte in der Hyphenbildung und in ihren invasiven Fähigkeiten. Die Schädigung von epithelialen Geweben durch die $\Delta eed1$ Mutante war ebenfalls signifikant attenuiert. In Adhärenzversuchen an Epithelzellen zeigten die $\Delta eed1$ Zellen eine den Kontrollstämmen entsprechende Adhärenz. Eine transiente

Elongation der *Δeed1* Zellen war ausreichend, um in die oberflächennahen Bereiche des epithelialen Gewebes zu penetrieren, bzw. durch induzierte Endozytose aufgenommen zu werden.

Um zu untersuchen inwieweit sich die Deletion von *EED1* auf die Expression hyphenspezifischer Gene auswirkte, wurde die Interaktion zwischen den *Δeed1* Zellen und dem oralen Epithelgewebe (RHE) auf molekularer Ebene analysiert. Dazu wurde das orale Epithelgewebe mit der *Δeed1* Mutante infiziert und die durch die Hybridisierung von Mikroarrays erstellten Transkriptionsprofile nach 1, 3, 6 und 24 h analysiert.

3.4.7.1 Clusteranalyse der Interaktionen der *Δeed1* Mutante mit dem oralen Epithelgewebe (RHE)

Die mikroskopischen Analysen der Interaktionen zwischen dem oralen Epithelgewebe und den Zellen der *Δeed1* Mutante hatten eine transiente Elongation der Pilzzellen gezeigt. Nach 24 h experimenteller Infektion konnten auf dem oralen Epithelgewebe ausschließlich Hefezellen oder kurzkettige Pseudohyphenzellen identifiziert werden. Diese Entwicklung spiegelte sich auch in den Transkriptionsprofilen der *Δeed1* Mutante wieder. In Abbildung 38 ist eine Clusteranalyse der Transkriptionsprofile der *Δeed1* Mutante und des parental Stammes dargestellt.

Die horizontale Analyse der Elemente (*condition tree*, CT) zeigt die hierarchische Baumstruktur, deren Äste die Ähnlichkeit der Elemente zueinander wiedergeben. Die verschiedenen Elemente stellen dabei die verschiedenen Zeitpunkte, des mit dem parental Stammes (PS) oder der *Δeed1* Mutante infizierten oralen Epithelgewebes dar. Die Clusteranalyse spiegelt auf molekularer Ebene deutlich die morphologische Ähnlichkeit der Zellen wieder. So wurden z.B. die frühen Zeitpunkte der Infektion mit dem parental Stamm mit den frühen Zeitpunkten der Infektion durch die *Δeed1* Mutante zueinander klassifiziert. Mit in diese Gruppe wurde auch der späte Zeitpunkt (24 h) der Infektion durch die *Δeed1* Mutante klassifiziert.

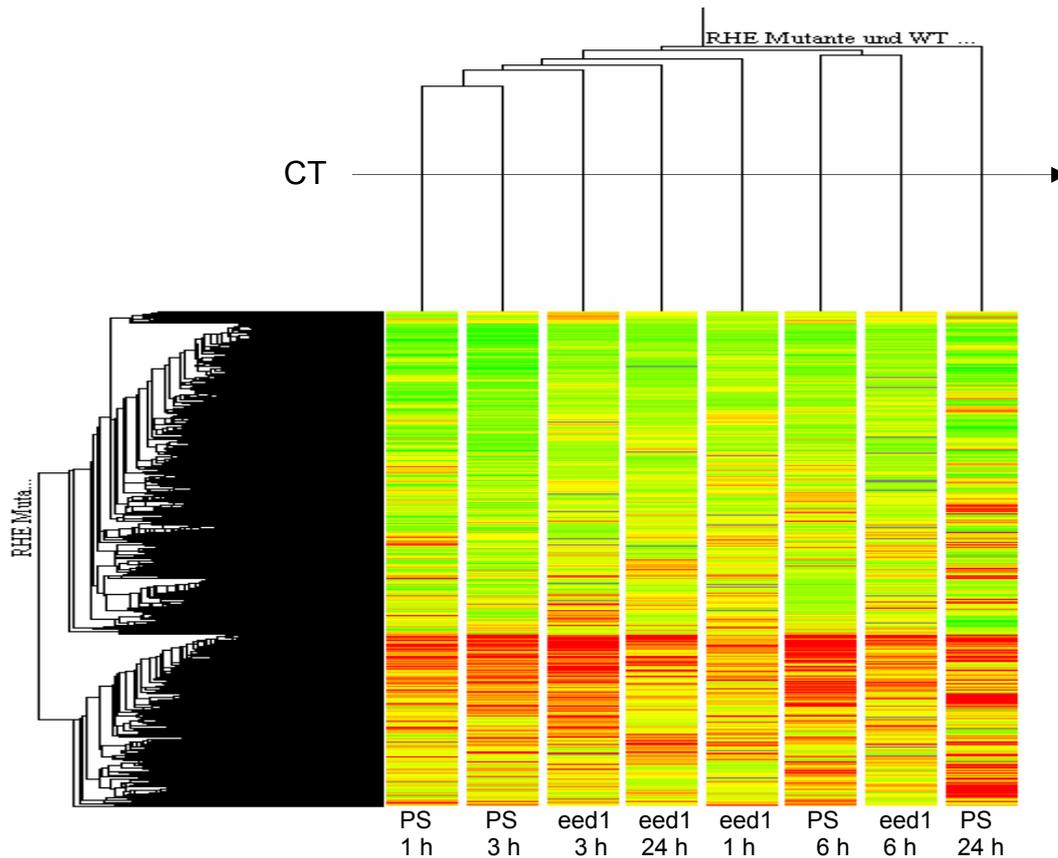


Abbildung 38. Clusteranalyse der Expressionsdaten der Interaktion der $\Delta eed1$ Mutante und des parentalen Stammes (PS) mit dem oralen Epithelgewebe (RHE)

Eine weitere Gruppe wurde durch die Transkriptionsprofile des mittleren Zeitpunktes gebildet (6 h), welche sich aus den Elementen der verschiedenen Stämme zusammensetzte. Der späte Zeitpunkt (24 h) der experimentellen Infektion durch den parentalen Stamm wurde zu keinem der anderen Zeitpunkte als ähnlich klassifiziert.

Die Clusteranalyse der Transkriptionsprofile der einzelnen Zeitpunkte spiegelt somit die während der mikroskopischen Analyse klassifizierten Morphologien der Pilzzellen wieder. Während die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante sich zu den frühen bis mittleren Zeitpunkten ähnlich den Zellen der Kontrollstämme verhielten (Hyphenbildung, Elongation), waren nach 24 h hauptsächlich Hefezellen mit dem Gewebe assoziiert. Das Transkriptionsprofil der Mutante nach 24 h weist daher deutlich größere Ähnlichkeiten zu den Transkriptionsprofilen des parentalen Stammes zu den frühen Zeitpunkten auf.

3.4.7.2 Die $\Delta eed1$ Mutante exprimiert hyphenassoziierte Gene

Während die $\Delta eed1$ Mutante im Gewebemodell ausschließlich transiente Hyphenbildung zeigte, zeigten sich im Transkriptionsprofil eine Reihe hyphenspezifischer Gene auf hohem Niveau exprimiert. In Abbildung 37 ist die Expression einiger hyphenspezifischer Gene im parentalen Stamm (A) und in der $\Delta eed1$ Mutante (B) dargestellt. Trotzdem die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante ausschließlich eine transiente Hyphenbildung zeigten, waren einige hyphenspezifische Gene auch zu den späten Zeitpunkten (24 h) auf hohem Niveau exprimiert (Abbildung 39). *ECE1*, ein ebenfalls hyphenspezifisches Gen, war in den frühen Zeitpunkten auf hohem Niveau exprimiert und wurde jedoch nach 24 h in der Mutante dramatisch herunterreguliert. Andere hyphenspezifische Gene wie *HYR1* zeigten, im Gegensatz zu dem parentalen Stamm, keine Induktion der Expression. Für die Gene der hyphenspezifischen Aspartatproteasen *SAP4-6* konnte in den Zellen der $\Delta eed1$ Mutante keine Expression nachgewiesen werden. Diese waren in den Zellen des parentalen Stammes, wenn auch nicht signifikant, auf hohem Niveau exprimiert. Wie in der Einleitung, Abschnitt 1.4.1.1: Regulation des Dimorphismus, beschrieben, wird die Induktion der Hyphenbildung über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert. Einen Signaltransduktionsweg stellt dabei der sogenannte MAP-Kinase Weg dar. Einige Komponenten dieses Weges zeigten sich in der $\Delta eed1$ Mutante (Abbildung 40, B) und in dem parentalen Stamm (Abbildung 40, A) während der experimentellen RHE Infektion gegensätzlich reguliert. In den Zellen des parentalen Stammes waren die regulatorischen Gene *TEC1* und *CPH2* nach 24 h auf hohem Niveau exprimiert, die Gene *CPH1* und *CEK1* wurden im Verlauf der experimentellen Infektion hingegen herunterreguliert. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Gene *TEC1* und *CPH2* in der Mutante nach 24 h herunterreguliert und die regulatorischen Gene *CPH1* und *CEK1* auf hohem Niveau exprimiert.

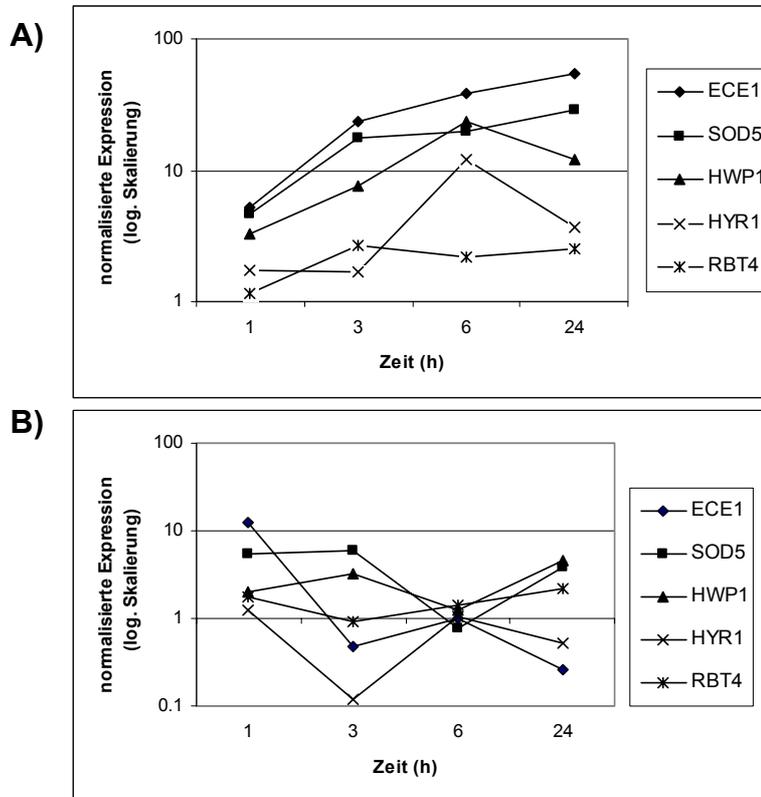


Abbildung 39. Expression hyphenspezifischer Gene in den Zellen der $\Delta eed1$ Mutante und des parentalen Stammes

Die Diagramme stellen die Expression der hyphenspezifischen Gene über den Verlauf der experimentellen Infektion des oralen Epithelgewebes dar. Zu den frühen Zeitpunkten der experimentellen Infektion waren die hyphenspezifischen Gene sowohl in der Mutante (B) als auch in dem parentalen Stamm (A) auf vergleichbarem Niveau exprimiert. Die Mehrheit der hyphenspezifischen Gene blieb auch in der Mutante auf hohem Niveau exprimiert, zeigte sich aber im parentalen Stamm über den Verlauf der experimentellen Infektion quantitativ stärker exprimiert.

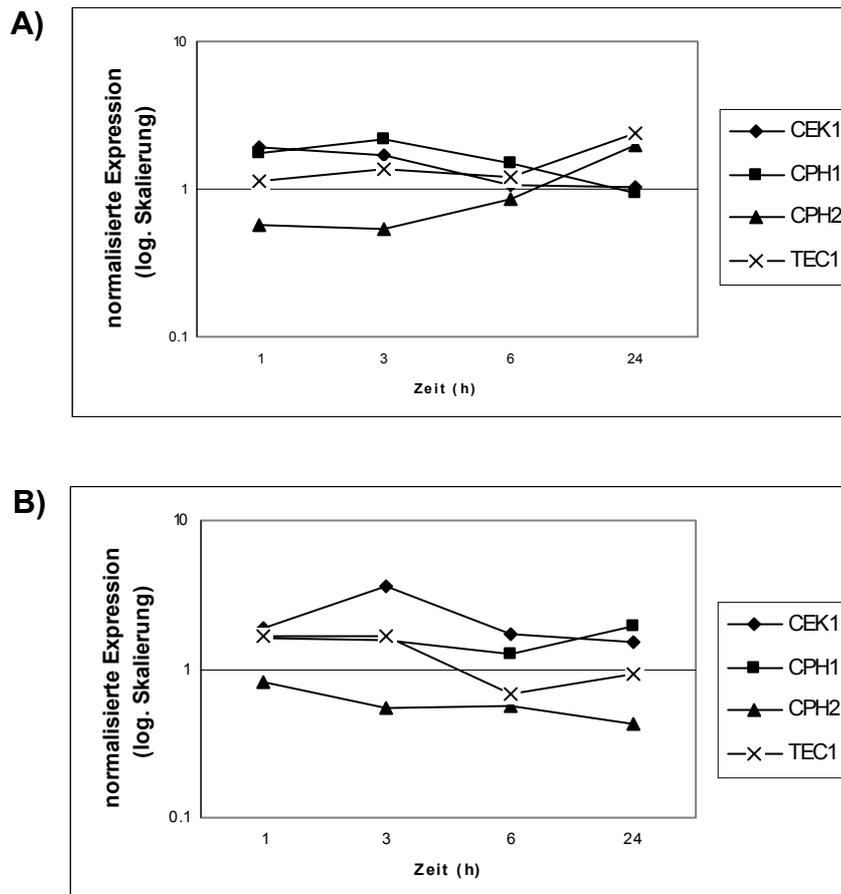


Abbildung 40. Differenziell exprimierte Gene des MAP-Kinase (MAPK-) Signaltransduktionsweges

In den Diagrammen ist die Expression einiger Gene des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges über den Verlauf der experimentellen Infektion (1-24 h) mit den Zellen des parental Stammes (A) und denen der *Δeed1* Mutante (B) dargestellt.

Weiterführende Analysen der Transkriptionsprofile zeigten ebenfalls eine differentielle Expression pH-assoziiertes Gene. Wie auch in Abschnitt 3.2.1.1: Analyse der Transkriptionsprofile der experimentellen RHE-Infektion, beschrieben, waren während der experimentellen Infektion mit den Wildtypzellen Gene auf hohem Niveau exprimiert, welche mit alkalisch-neutralen Umgebungsbedingungen assoziiert werden konnten. Im Gegensatz dazu waren in der *Δeed1* Mutante Gene auf hohem Niveau exprimiert, die mit saurem pH-Milieu assoziiert werden konnten (z.B. *PHR1*). Die mit nitrosativem Stress assoziierten Gene waren in der Mutante, im Unterschied zu den Zellen des parental Stammes, zu den späten Zeitpunkten (24 h) nicht auf hohem Niveau exprimiert.

Hinsichtlich möglicher Funktionshomologien der Proteine Eed1p in *C. albicans* und des Proteins Def1p in *S. cerevisiae* wurden die Transkriptionsprofile in diese Richtung analysiert. So wurden z.B. Gengruppen vergleichend analysiert die mit DNA-Reparaturmechanismen, Telomerverkürzung oder Ubiquitinylierung assoziiert waren. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen des parental Stammes und der $\Delta eed1$ Mutante hinsichtlich der untersuchten Gengruppen identifiziert werden.