

## 3. Ergebnisse

Die Untersuchungen zur Invasivität von *Candida albicans* stützen sich vor allem auf den Vergleich eines invasiven (SC5314) und eines nicht-invasiven (ATCC10231) Stamms.

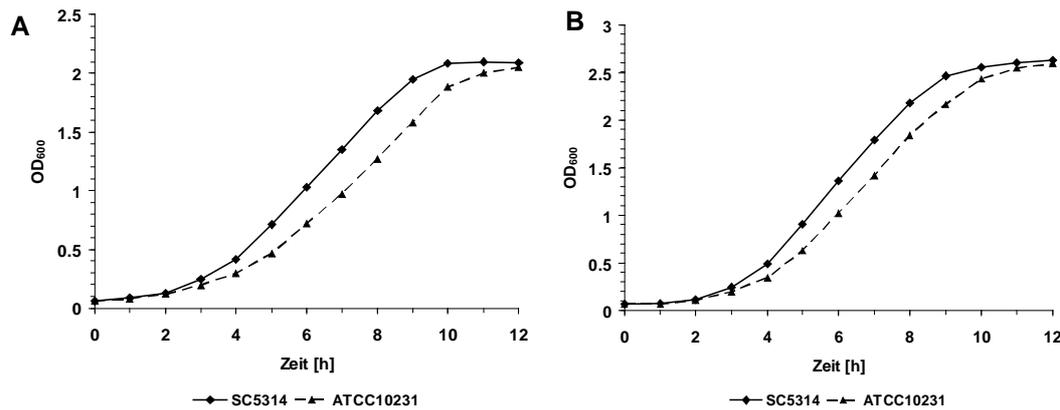
Dazu wurde zunächst versucht den Stamm ATCC10231 phänotypisch und genotypisch im Vergleich zu SC5314 zu charakterisieren. Weiterhin wurde über vergleichende Transkriptomanalysen versucht, Gene zu identifizieren, welche eine Rolle bei der Invasion spielen könnten. Dies geschah auf der Ebene der beiden Stämme im direkten Vergleich, aber auch auf der Ebene von SC5314 alleine, wobei der zeitliche Verlauf der Invasion näher betrachtet wurde. Schließlich wurden Gene, die eine Rolle bei der Invasion spielen könnten, identifiziert und charakterisiert.

### 3.1 Phänotypische Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231

Vor der molekularen Untersuchung zur Invasivität wurde zunächst versucht, die beiden Stämme phänotypisch zu vergleichen. Es wurden neben allgemeinen Wachstumsversuchen auch die Interaktionen mit Wirtszellen betrachtet.

#### 3.1.1 Wachstum und Tropftests

Das Wachstum der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 wurde zunächst in definiertem SD-Medium und in komplexem YPD-Medium verfolgt. Abbildung 3.1 zeigt, dass der Stamm ATCC10231 sowohl in SD-Medium als auch in YPD-Medium später in die logarithmische Phase eintritt. In der logarithmischen Phase ist die Verdopplungszeit allerdings recht ähnlich, so dass sich die Wachstumskurven in der stationären Phase wieder angleichen.



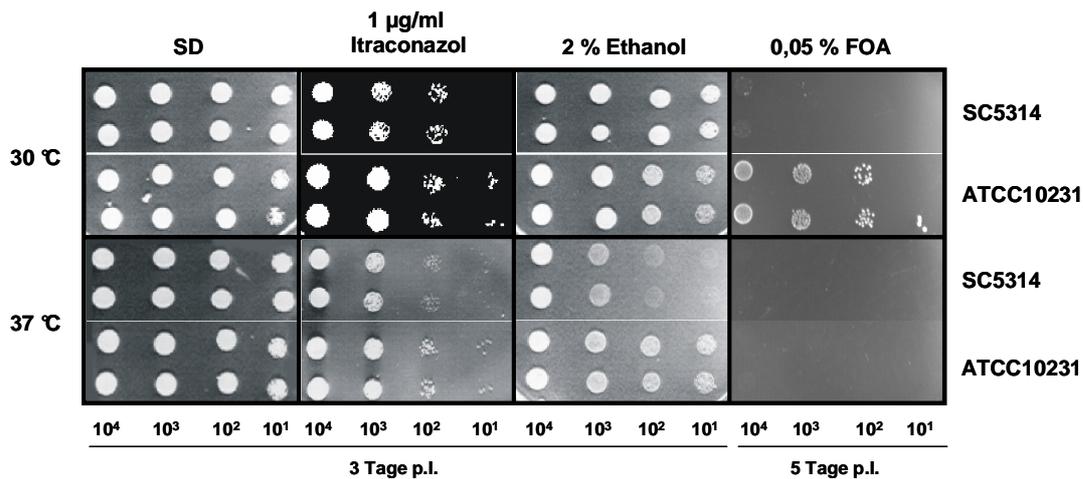
**Abb. 3.1:** Wachstum der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 in SD-Medium (A) und YPD-Medium (B).

Für weitergehende phänotypische Untersuchungen wurden Festmedien verwendet, die mit verschiedenen Zusätzen versehen worden sind. Da ein besonders breites Spektrum an potentiellen Phänotypen untersucht werden sollte, wurden die Medien unter diversen Gesichtspunkten ausgewählt. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht der ausgewählten Medien wieder.

**Tabelle 3.1:** Medien für Tropftests zur phänotypischen Charakterisierung von ATCC10231. Wenn nicht anders angegeben wurden die Medien bei 30 °C und 37 °C inkubiert.

Test auf...	Medium/Anzucht/Zusatz
Kontrolle	SD, YPD
Kohlenstoffquelle	Glukose, Galaktose, Glycerol, Mannitol, Ethanol, ohne C-Quelle (YP-Medium)
pH-Wert	pH 4, 5, 6, 7, 8
Temperatur	18 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C
Erhöhte Kationenkonzentration	CaCl <sub>2</sub> , NaCl
Anaerobes Wachstum	Anaerobiertopf; YPS-Agar (microaerophil)
Hypheninduktion	Serum, Lee's, Spider, GlcNac, eingebettet (YPS-Agar)
Antimykotika-Resistenz	Amorolfin, Amphotericin B, Caspofungin, Hygromycin B, Itraconazol, Nikkomycin Z
Stress	Calcofluor, Congo Rot, Ethanol, SDS, Koffein, 5-FOA, NaF, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Extrazelluläre Enzyme	BSA, Eigelbagar

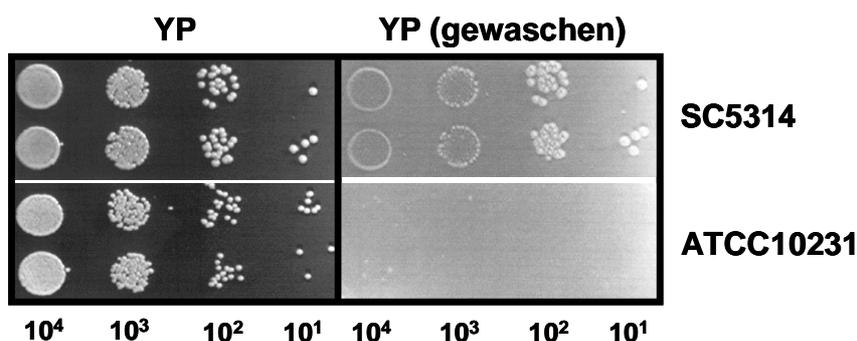
Wie sich durch die Tropftests zeigte, sind die beiden Stämme SC5314 und ATCC10231 in ihrem Wachstum auf den verschiedenen Medien nahezu identisch. So zeigten sich auf allen Medien bis auf SD-Medium, welches mit 1 µg/ml Itraconazol supplementiert wurde, SD-Medium, welches mit 0,05 % 5-Fluoroorotsäure (5-FOA) supplementiert wurde, und SD-Medium, welches als C-Quelle Ethanol anstatt Glukose aufwies (Abb. 3.2), keine Unterschiede im Wachstum.



**Abb. 3.2:** Phänotypische Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231 nach Tropftest. p.I. = post Inokulation.

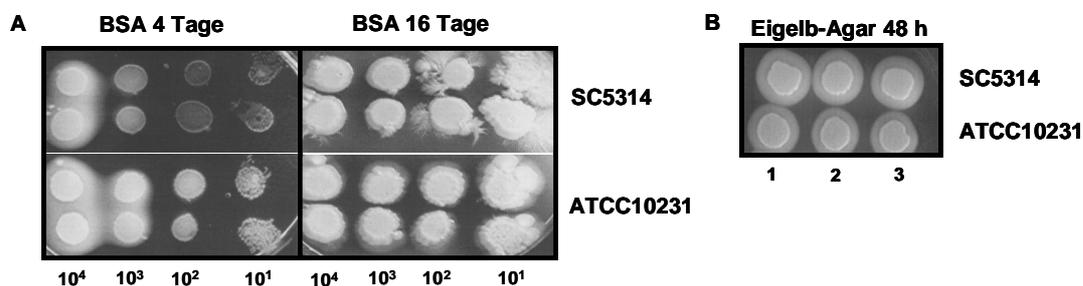
Wie in der Abb. 3.2 zu erkennen ist, bezogen sich die phänotypischen Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231 auf eine erhöhte Resistenz von ATCC10231 gegenüber Itraconazol (30 °C und 37 °C), Ethanol bei 37 °C und besonders gegenüber 5-FOA bei 30 °C.

Alle Medien wurden auch auf Invasion der beiden Stämme in die Agaroberfläche untersucht. Dazu wurden nach der Beendigung des Wachstumstest die Agaroberflächen mit Wasser und einem Drigalskispatel oberflächlich von adhärenen *Candida*-Zellen befreit und das darunter befindliche Medium auf Invasion überprüft. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen ausgemacht. Bis auf die Hyphen-induzierenden Medien zeigten die Stämme auf allen Medien keine nennenswerte Invasion. Eine Ausnahme ergab sich jedoch bei Komplexmedium, dem keine Glukose zugesetzt wurde (YP-Medium (Cullen und Sprague, 2000)). Bei diesem Medium war das oberflächliche Wachstum der beiden Stämme identisch, nach dem Abwaschen der Zellen zeigte sich jedoch, dass nur der Stamm SC5314 in die Agaroberfläche eingedrungen war (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Invasion in YP-Agar 3 Tage p.I. Die Invasion von SC5314-Zellen in den Agar ist nach dem Waschen deutlich zu erkennen.

Ein weiteres Augenmerk lag auf der Untersuchung der beiden *C. albicans* Stämme auf extrazelluläre hydrolytische Enzym-Aktivität. Da hier insbesondere die sekretorischen Aspartatproteasen und die Lipasen/Phospholipasen für die Pathogenität eine Rolle spielen (Schaller *et al.*, 2005), wurden die beiden Stämme auf Medien getropft, die gezielt die Aktivität der oben genannten Enzymen nachweisen können. Für die Proteasen wurde zum Nachweis BSA-Medium verwendet, da hier das Albumin die einzige N-Quelle darstellt. Für den Nachweis der Lipase/Phospholipase-Aktivität wurden die beiden Stämme auf Eigelbagar aufgebracht (Ibrahim *et al.*, 1995).



**Abb. 3.4:** Tropftest auf hydrolytische Enzymaktivität. **(A)** Test auf Protease-Aktivität auf BSA-Medium. Nach 4 Tagen bei 30 °C zeigte sich ein durch die Ansäuerung des Mediums gebildeter Präzipitationshof rund um die Kolonien. Nach 16 Tagen war das Medium durch den Abbau der Proteine wieder klar und es hatten sich bei beiden Stämmen deutlich Hyphen ausgebildet. **(B)** Test auf Lipase/Phospholipase-Aktivität. Beide Stämme zeigten Aktivität bei 30 °C, welche durch die Präzipitationshöfe rund um die Kolonien deutlich wurde. Die Stämme wurden nur in einer Verdünnungsstufe (10<sup>5</sup> Zellen) als Triplikate aufgetropft.

Wie in der Abbildung 3.4 zu erkennen ist, zeigen beide Stämme ein nahezu identisches Verhalten auf BSA- bzw. Eigelbagar. Der einzige Unterschied bestand darin, dass Stamm ATCC10231 auf BSA-Medium eher einen Präzipitationshof zeigte als Stamm SC5314.

Da zunächst keine weiteren phänotypischen Unterschiede in Bezug auf das Wachstum der beiden Stämme gefunden wurden, wurde ein Unterschied, nämlich der verlangsamte Eintritt von ATCC10231 in die logarithmische Phase in SD-Medium, näher charakterisiert.

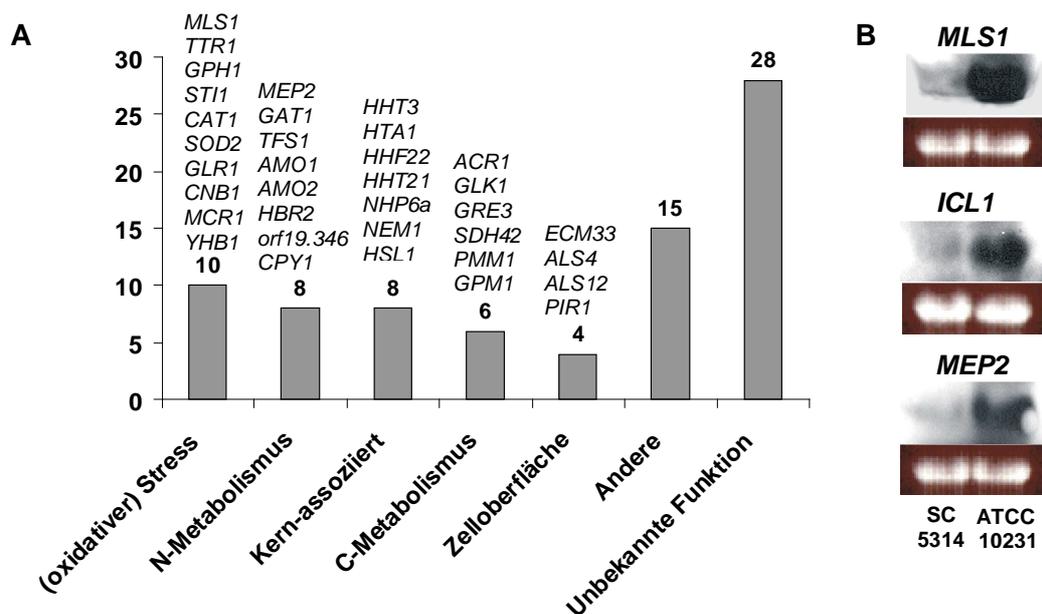
### 3.1.2 Wachstum in SD-Medium: Transkriptionsprofil und N-Quellen

Für die Charakterisierung des unterschiedlichen Wachstums der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 wurden Transkriptionsprofile von beiden Stämmen zu einem frühen Zeitpunkt der logarithmischen Phase ( $OD_{600} = 0,15$ )

erstellt. Es konnte hier bereits beobachtet werden, dass zum Erreichen der  $OD_{600}$  von 0,15 ATCC10231 ca. 10-15 min länger benötigte als SC5314 (vgl. Abb. 3.1 A).

Für die Erstellung der Transkriptionsprofile wurden Microarrays verwendet, die fast das komplette Genom von *C. albicans* als PCR-Produkte enthalten. Es wurde die RNA von SC5314 und ATCC10231 zu dem angegebenen Zeitpunkt ( $OD_{600} = 0,15$ ) extrahiert und es wurde Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNA synthetisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Arrays gewaschen und gescannt und die Daten wurden zur Auswertung in die Software *GeneSpring* transferiert.

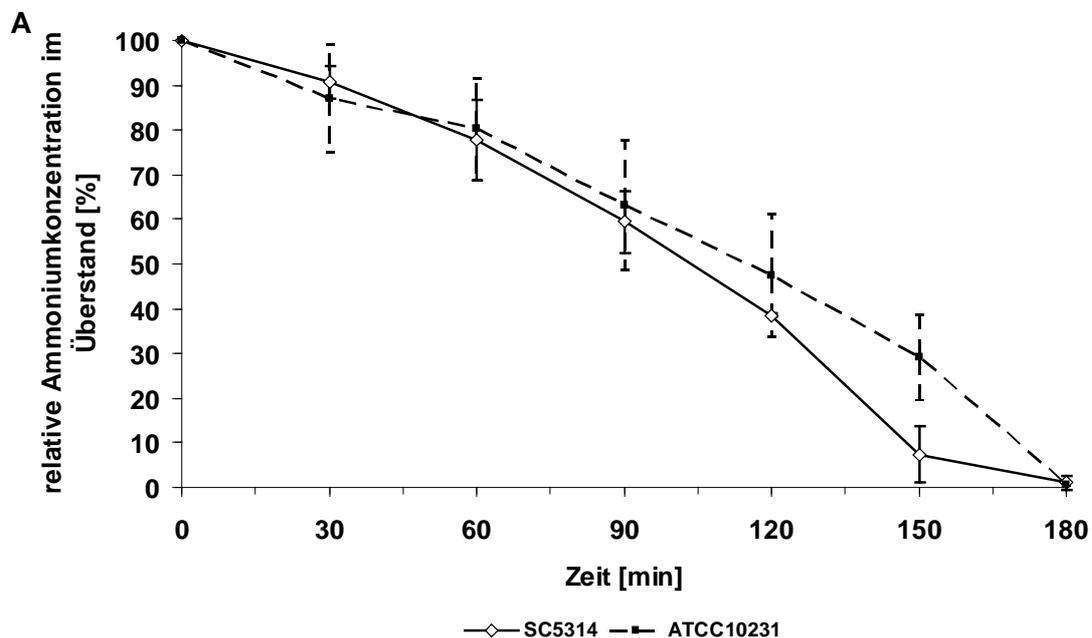
Es wurden insgesamt 79 Gene identifiziert, die eine mindestens zweimal stärkere Expression in ATCC10231 im Vergleich zu SC5314 aufwiesen und deren Expressionsunterschied statistisch signifikant mit  $P \leq 0,05$  war. Eine Einteilung dieser Gene in Bezug zu ihrer Funktion ist in Abbildung 3.5 A dargestellt. Die vollständige Liste aller 79 Gene ist dem Anhang (Tabelle A1) zu entnehmen. Die größte Gruppe der differentiell exprimierten Gene ist die Gruppe der Gene mit unbekannter Funktion (28 Gene). Danach folgen die Gruppe mit Stress-assoziierten Genen (10 Gene) und die Gruppen der Gene, die in den Stickstoff-Metabolismus involviert oder Kern-assoziiert sind (je 8 Gene). Schließlich gibt es noch zwei kleinere Gruppen, deren Gene in den Kohlenstoff-Metabolismus involviert sind (6 Gene) bzw. mit Genen, deren Proteine auf der Zelloberfläche lokalisieren (4 Gene). Für die restlichen 15 Gene konnten keine spezifischen Gruppen mit mehr als 2 Mitgliedern gebildet werden.

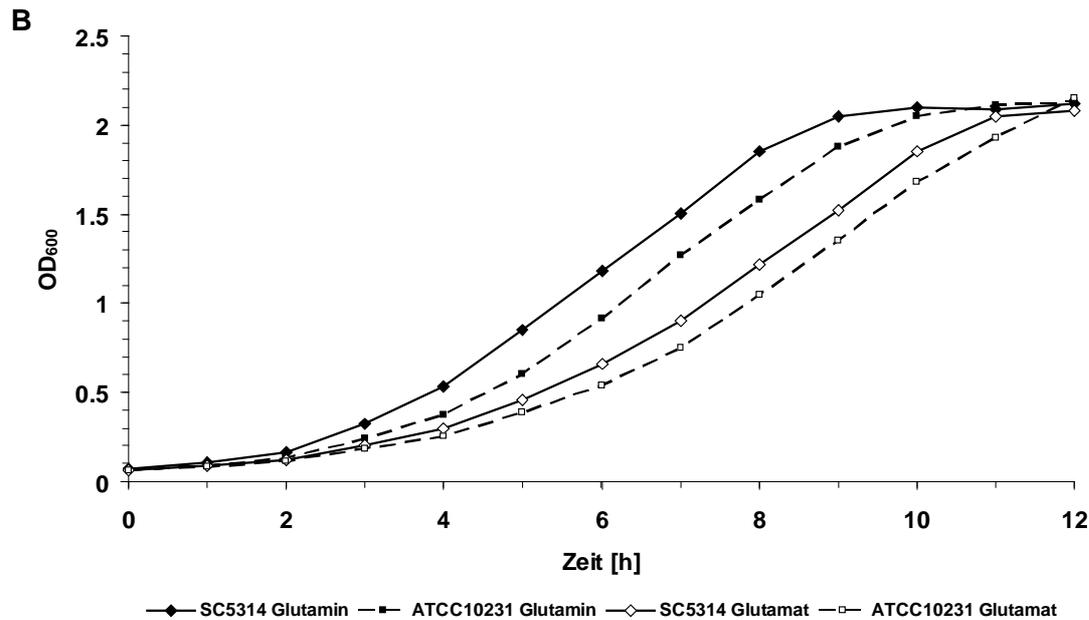


**Abb. 3.5:** (A) Einteilung der 79 in SD-Medium (frühe log-Phase) stärker exprimierten Gene aus ATCC10231 in funktionelle Gruppen. Eine vollständige Liste aller 79 Gennamen ist dem Anhang (Tabelle A1) zu entnehmen. (B) Northern-Blot von drei ausgewählten Genen zur Bestätigung der Microarray-Daten. Als Ladekontrolle wurde die Ethidiumbromid-gefärbte rRNA verwendet.

Neben der hohen Anzahl an Stress-assoziierten Genen ist in Abb. 3.5 A auffällig, dass es auch eine hohe Zahl an stark exprimierten Genen gibt, die mit dem Stickstoff-Metabolismus assoziiert sind. Insbesondere die stärkere Expression von *MEP2* (Abb. 3.5 B), einem Gen welches normalerweise unter niedrigen Ammonium-Konzentrationen exprimiert wird (Biswas und Morschhauser, 2005), warf die Frage auf, ob der verzögerte Eintritt von ATCC10231 in die logarithmische Phase in Zusammenhang mit einer ungenügenden Stickstoffversorgung der Zelle stand.

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen wurde zum einen die Ammoniumaufnahme der beiden Stämme bestimmt und zum anderen sollte versucht werden durch andere (u. a. leichter verstoffwechselbare) Stickstoffquellen das unterschiedliche Wachstum auszugleichen.





**Abb. 3.6:** (A) Abnahme der Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand im zeitlichen Verlauf. (B) Wachstum der beiden Stämme in synthetischem SD-Medium mit Glutamin bzw. Glutamat als N-Quelle.

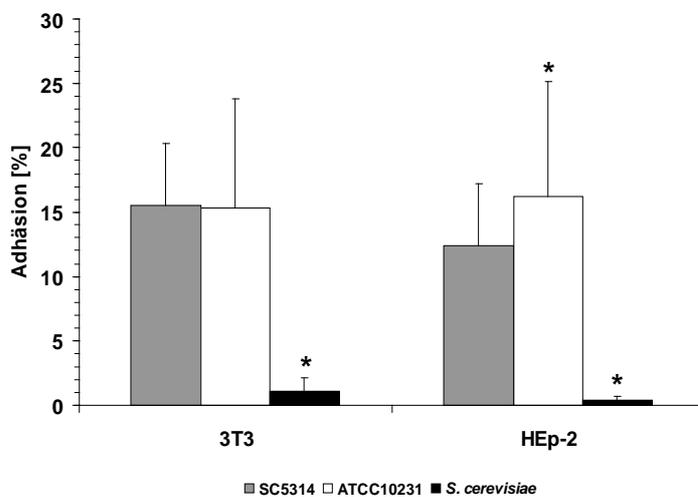
Abbildung 3.6 A zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Ammoniumaufnahme der beiden Stämme gibt. Nach 180 Minuten konnte bei beiden Stämmen nur noch eine minimale Menge an Ammonium im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Abbildung 3.6 B zeigt, dass ein Austausch der N-Quelle keinen Effekt auf das unterschiedliche Wachstum der beiden Stämme hatte. Zwar gibt es einen Unterschied in Bezug auf die Verwertbarkeit der Stickstoff-Quelle, dies schlug sich aber nicht in einem angeglichenen Wachstum der beiden Stämme nieder.

Es wurden weitere Stickstoff-Quellen wie Harnstoff oder auch diverse Aminosäurepools (aliphatische Aminosäuren [Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin], aromatische Aminosäuren [Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan], schwefelhaltige Aminosäuren [Cystein, Methionin], saure Aminosäuren [Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat], basische Aminosäuren [Lysin, Arginin, Histidin] und andere Aminosäuren [Serin, Threonin, Prolin]) eingesetzt. Alle getesteten Stickstoff-Quellen zeigten keine Angleichung in der Wachstumsrate der beiden *C. albicans*-Stämme (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3 Adhäsion an Wirtszellen

Neben den Wachstumsversuchen und Tropftests sollte auch untersucht werden, ob sich die beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 außer bei der Invasion nach intraperitonealer Infektion (Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b) auch in weiteren Wirt-Pathogen-Interaktionen unterscheiden.

Da die Adhäsion an Wirtszellen den ersten Schritt einer erfolgreichen Invasion darstellt, wurde zunächst die Adhäsion der beiden Stämme an Epithelzellen bzw. Fibroblasten analysiert (Abb. 3.7).

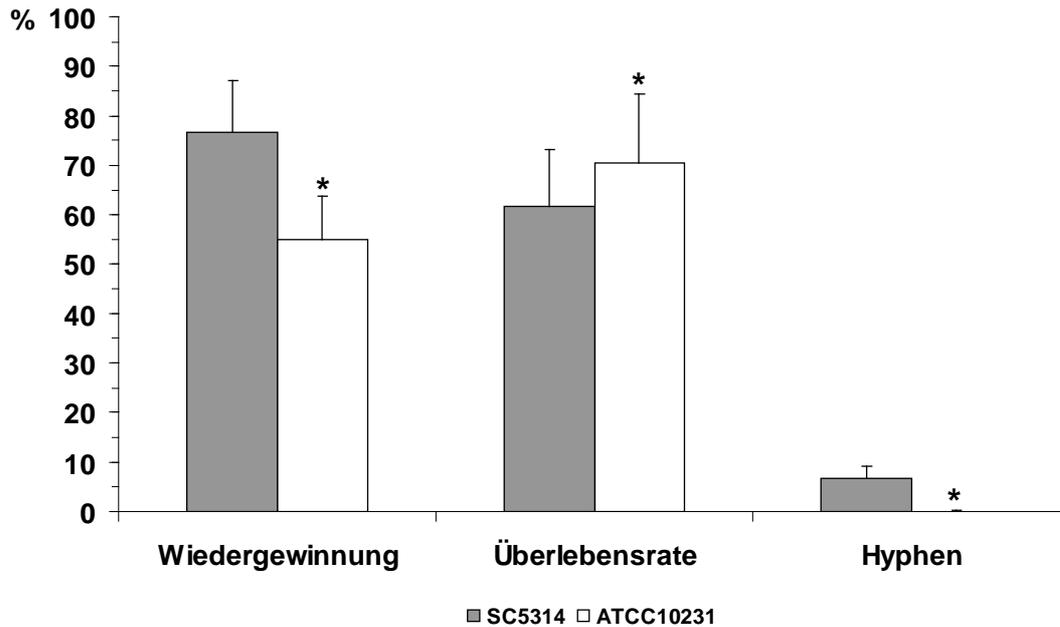


**Abb. 3.7:** Adhäsion an Wirtszellen. Für die Untersuchung wurden Fibroblasten (3T3) und Epithelzellen (HEp-2) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde *S. cerevisiae* verwendet. \* = signifikanter Unterschied zu SC5314 mit  $P \leq 0,05$ .

In Abbildung 3.7 ist zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Adhäsion der beiden Stämme an Fibroblasten (3T3) gibt. Bei den Epithelzellen (HEp-2) zeigte sich jedoch eine leicht stärkere Adhäsion von ATCC10231 gegenüber SC5314. Beide Stämme zeigten jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle *S. cerevisiae* eine deutliche Adhäsion an die Wirtszellen.

### 3.1.4 Interaktion mit Makrophagen

Als nächstes wurde untersucht, ob die beiden Stämme Unterschiede bei der Interaktion mit Makrophagen zeigen. Dazu wurde nach Inkubation und Waschen neben der Wiedergewinnungsrate (adhärente und phagozytierte Zellen) auch die Überlebensrate der wieder gewonnenen *Candida*-Zellen bestimmt. Weiterhin wurde innerhalb der wieder gewonnenen Zellen der Anteil an gekeimten Zellen (Hyphen) gezählt.

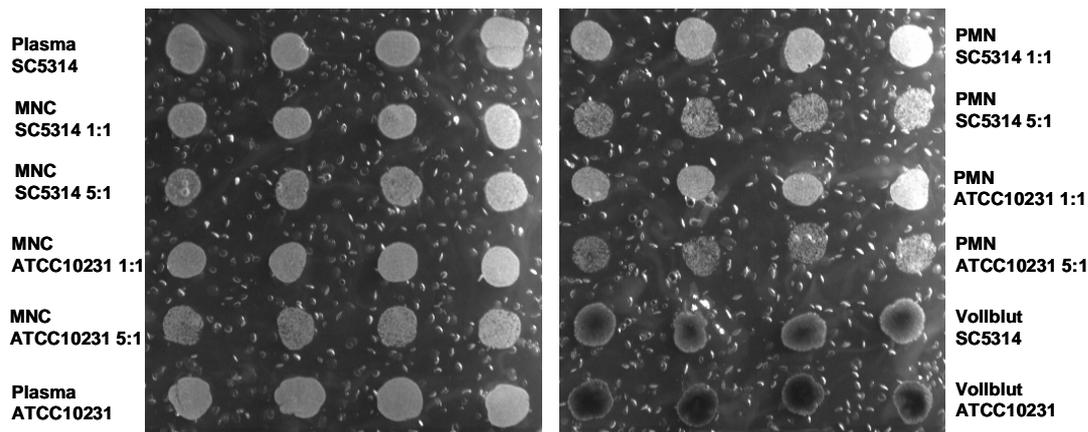


**Abb. 3.8:** Interaktion von SC5314 und ATCC10231 mit Makrophagen. Es wurde die Wiedergewinnung, die Überlebensrate der wieder gewonnenen Zellen und die Anzahl an Hyphen pro Stamm bestimmt. \* = signifikanter Unterschied zu SC5314 mit  $P \leq 0,05$ .

Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, war die Wiedergewinnungsrate von Stamm ATCC10231 nach der Inkubation mit Makrophagen signifikant niedriger als von SC5314. Im Gegensatz dazu war die Überlebensrate von ATCC10231 signifikant höher als die Überlebensrate von SC5314. Ein dritter auffälliger Punkt war, dass Stamm ATCC10231 praktisch keine Keimschläuche (Hyphen) ausgebildet hatte.

### 3.1.5 Interaktion mit Blut und Blutkomponenten

Um weitere Interaktionen mit Komponenten des Immunsystems zu untersuchen, wurde humanes Vollblut durch eine Dichte-gradientenzentrifugation in die Bestandteile Plasma, Mononukleäre Zellen (MNC) und Granulozyten (Polymorphonukleäre Zellen; PMN) aufgetrennt. Nach einer anschließenden 30minütigen Inkubation der *Candida*-Zellen in Vollblut, Plasma oder mit einer der beiden Zellfraktionen (Verhältnis Immunzellen:*Candida* = 1:1 oder 5:1), wurden die Ansätze auf M199-Medium getropft und bei 37 °C inkubiert. Die Verwendung von M199-Medium ermöglichte den Blutzellen bis zur Trocknung der Oberfläche weiter zu überleben, so dass die effektive Inkubationsdauer der *Candida*-Zellen mit den Immunzellen bzw. dem Vollblut länger als 30 min dauerte. Abbildung 3.9 zeigt das Ergebnis der Co-Inkubation.



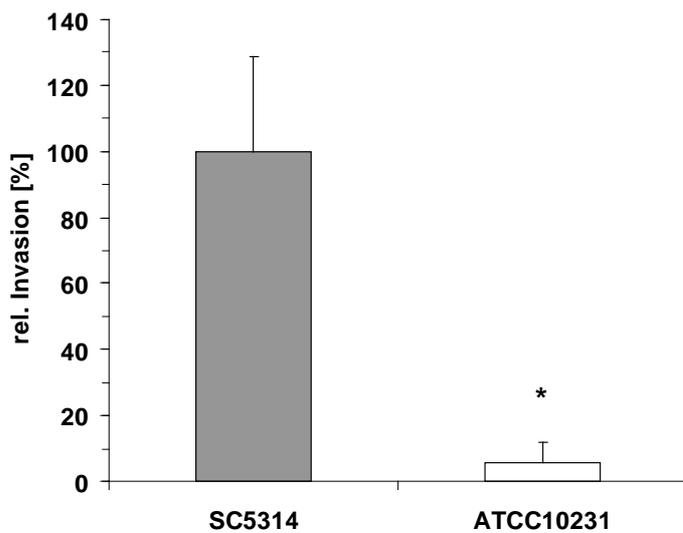
**Abb. 3.9:** Interaktion der *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 mit Komponenten des Bluts. Neben Vollblut und Plasma wurde auch die Interaktion mit Mononukleären Zellen (MNC) und Granulocysten (PMN) in den Verhältnissen Immunzellen:*Candida* = 1:1 und 5:1 untersucht. Die Aufbringung auf M199-Medium erfolgte in vierfacher Ausfertigung.

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, gab es zwischen den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 keinen Unterschied in Bezug auf das Wachstum nach einer Inkubation mit Blutkomponenten. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass bei einer höheren Anzahl an MNC und insbesondere PMN das Wachstum der *Candida*-Zellen deutlich reduziert war.

### 3.1.6 Invasion in Matrigel

Es war bereits bekannt, dass die beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 eine unterschiedliche Invasivität in Wirtsgewebe nach einer intraperitonealen Infektion aufweisen (Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b). Es lag jedoch bisher kein Modell vor, welches *in vitro* diesen Aspekt nachstellen konnte. Deshalb wurde nach einem veränderten Protokoll von Crowe *et al.* (Crowe *et al.*, 2003) die Invasion bzw. die Transmigration von *C. albicans* durch Matrigel, einem Gemisch aus extrazellulären Wirtsproteinen, untersucht.

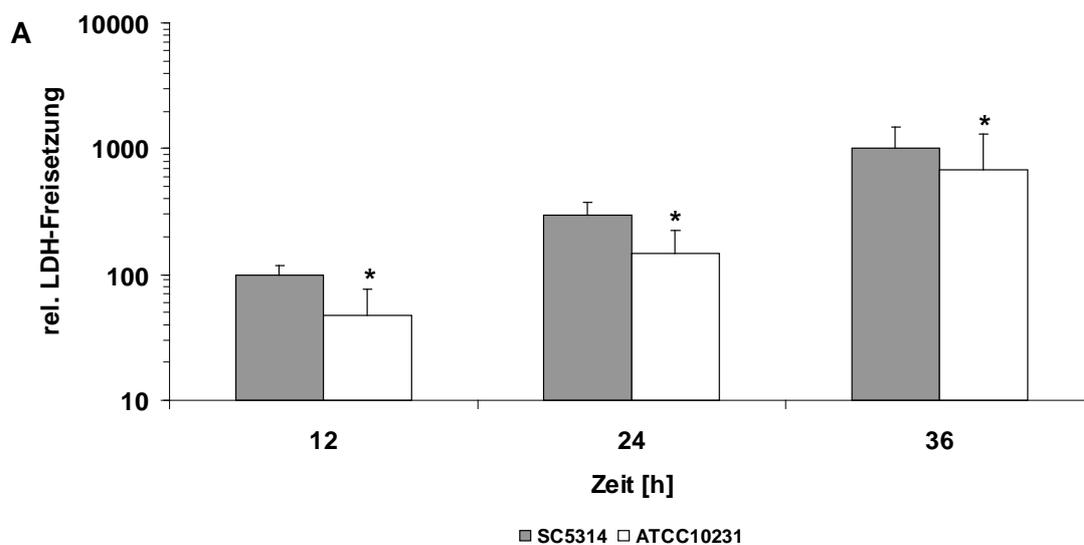
Abbildung 3.10 zeigt, dass im Vergleich zum stark invasiven Stamm SC5314 ATCC10231 nur eine Invasion/Transmigration von ca. 6 % zeigte. Weiterhin konnte durch mikroskopische Analysen des Matrigels beobachtet werden, dass Stamm SC5314 lange Hyphen ausbildete, wo hingegen Stamm ATCC10231 deutlich kürzere Hyphen und vor allem Pseudohyphen bildete (Daten nicht gezeigt).

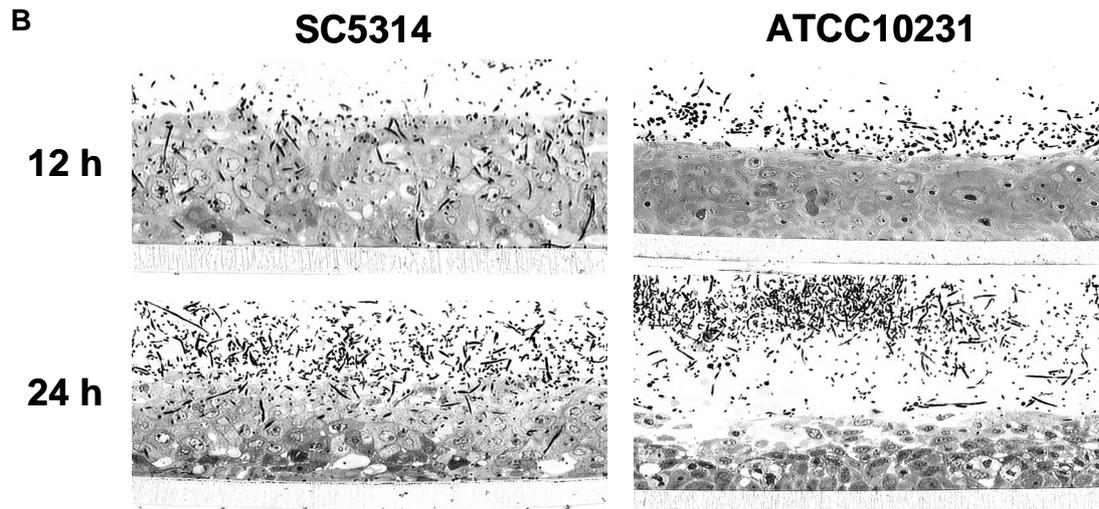


**Abb. 3.10:** Invasion in Matrigel. Die Daten sind relativ in Bezug zu SC5314 dargestellt. \* = signifikanter Unterschied zu SC5314 mit  $P \leq 0,05$ .

### 3.1.7 Infektion von rekonstituiertem humanen Epithel (RHE)

Als letzter Punkt der *in vitro* Vergleiche der beiden Stämme wurde die Infektion von rekonstituiertem humanen oralen Epithel (RHE) untersucht. Dazu wurde das RHE mit beiden Stämmen infiziert und die Infektion wurde über einen Zeitraum von 36 Stunden verfolgt. Es wurden sowohl histologische Präparate analysiert als auch die Zerstörung des Epithels anhand der Menge an freigesetzter Lactat-Dehydrogenase (LDH) gemessen.





**Abb. 3.11:** RHE-Infektion mit den *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231. Sowohl die LDH-Freisetzung in (A) als auch die histologischen Aufnahmen in (B) zeigen, dass ATCC10231 deutlich weniger Schäden im RHE hervorruft und weniger invasiv ist (B). \* = signifikanter Unterschied zu SC5314 mit  $P \leq 0,05$ .

An der freigesetzten Menge Lactat-Dehydrogenase in das Medium ist zu erkennen, dass Stamm ATCC10231 das RHE schädigen konnte, es aber eine Verzögerung der Schädigung im Vergleich zu SC5314 gab (Abb. 3.11 A). Die histologischen Aufnahmen zeigen, dass Stamm SC5314 bereits nach 12 h in das RHE eingedrungen ist. Nach 24 h waren sehr viele Zellen des RHE lysiert. Im Gegensatz dazu zeigte Stamm ATCC10231 keine Invasion in das RHE. Der Stamm war aber in der Lage Hyphen auszubilden und die Epithelzellen nach 24 h oberflächlich zu lysieren (Abb. 3.11 B).

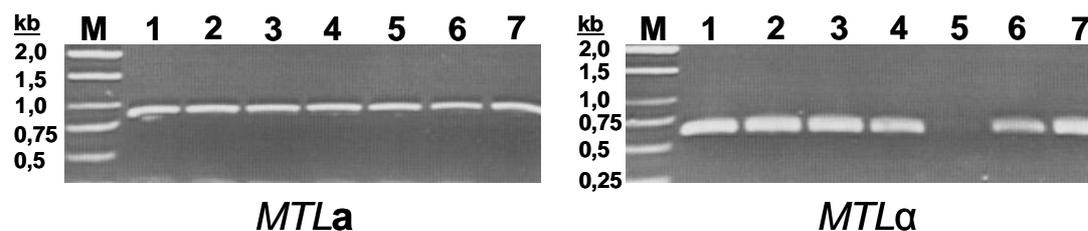
### 3.2 Genotypische Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231

Neben den phänotypischen Unterschieden zwischen den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 wurden auch die genotypischen Unterschiede analysiert. Ein erster Unterschied ergab sich bereits in der Anzahl der Chromosomen. Während Stamm SC5314 die gängigen 8 Chromosomen aufweist (1-7 + R) fehlt in ATCC10231 Chromosom 1, dafür gibt es allerdings ein zusätzliches Chromosom 2 (2+; persönliche Mitteilung B.B. Magee, University of Minnesota, USA). In dieser Arbeit wurde neben der Analyse des Paarungstyps (*mating type*) und einer Intron-Analyse des 25S rDNA Gens vor allem versucht durch vergleichende

Genomhybridisierungen Unterschiede in den beiden Genomen zu entdecken. Als Referenzen wurden zusätzlich *C. albicans* Patientenisolate in die Analyse mit einbezogen.

### 3.2.1 Paarungstyp von SC5314 und ATCC10231

Der *C. albicans* Stamm ATCC10231 zeigte eine erhöhte Resistenz gegenüber Itraconazol (Abb. 3.2). Da eine erhöhte Resistenz gegenüber den Azolen im Zusammenhang mit dem Paarungstyp (*mating type*) stehen kann (Rustad *et al.*, 2002), wurden die beiden Stämme SC5314 und ATCC10231 durch eine PCR-Analyse mit spezifischen Primern für den Paarungstyp **a** (*MTLa*) bzw. den Paarungstyp  $\alpha$  (*MTL $\alpha$* ) untersucht. Da es eventuell auch einen Zusammenhang zwischen Paarungstyp und Virulenz geben könnte (Lockhart *et al.*, 2005), würde die Analyse des Paarungstyps auch einen Hinweis auf die Ursache der unterschiedlichen Invasivität der beiden Stämme liefern. Der Zusammenhang zwischen Paarungstyp und Virulenz ist jedoch nicht unumstritten (Ibrahim *et al.*, 2005). In die Paarungstypanalyse wurden weitere *C. albicans* Isolate einbezogen. Insbesondere die Patientenisolate C73, C76, C78 und C81 wurden mit berücksichtigt, da diese später in der vergleichenden Genomhybridisierung eingesetzt wurden.



**Abb. 3.12:** Paarungstypanalyse verschiedener *C. albicans* Stämme. Es wurde mittels PCR getestet ob der Paarungstyp homozygot (nur *MTLa* oder nur *MTL $\alpha$* ) oder heterozygot (*MTLa* und *MTL $\alpha$* ) ist. 1 = SC5314, 2 = ATCC10231, 3 = ATCC10261, 4 = C73, 5 = C76, 6 = C78, 7 = C81, M = 1-kb-Leiter. Größenangaben der Markerbanden in Kilobasen (kb).

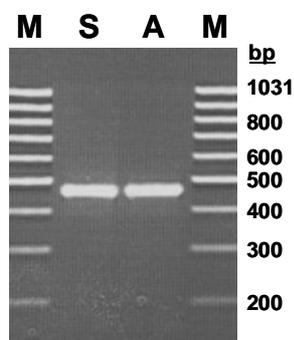
Abbildung 3.12 zeigt, dass fast alle getesteten *C. albicans* Stämme heterozygot in Bezug auf den Paarungstyp sind. D.h., dass die Stämme sowohl *MTLa* als auch *MTL $\alpha$*  in ihrem Genom besitzen. Die einzige Ausnahme der getesteten Stämme war das Patientenisolat C76. Dieses Isolat ist homozygot für *MTLa*, d.h., dass in diesem Isolat kein *MTL $\alpha$* -Gen nachgewiesen werden konnte.

Zwischen SC5314 und ATCC10231 gibt es weiterhin den Unterschied, dass sich der Paarungstyp-Lokus (*mating type locus*, *MTL*) bei SC5314 auf Chromosom 5 befindet. Bei ATCC10231 hingegen befindet sich *MTL $\alpha$*  auf Chromosom 5 und *MTL $\beta$*  auf Chromosom 4 (persönliche Mitteilung B.B. Magee)

### 3.2.2 Intronanalyse der 25S rDNA

In einer Arbeit von Karahan *et al.* konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Invasivität eines *C. albicans* Stamms geben könnte (Karahan *et al.*, 2004). Die Ermittlung des Genotyps beruhte dabei auf der Analyse der transposablen Intronregion des 25S rRNA Gens (rDNA). Mit dieser Methode können *Candida*-Isolate in fünf verschiedene Genotypen eingeteilt werden (A-E), wobei die Genotypen A-C nur *C. albicans* Isolate aufweisen und die Genotypen D und E spezifisch für *C. dubliniensis* sind.

In dieser Arbeit wurde die 25S rDNA mittels PCR untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Invasivität der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 herstellen zu können.



**Abb. 3.13:** Analyse der transposablen Intronregion des 25S rRNA Gens (rDNA). Sowohl SC5314 (S) als auch ATCC10231 (A) zeigen eine Bandengröße nach Auftrennung in einem 3%igen TAE-Gel von ca. 450 Basenpaaren (bp). Dies entspricht dem Genotyp A. M = 100-bp-Leiter. Größenangabe der Markerfragmente in Basenpaaren.

Wie die obige Abbildung 3.13 zeigt, konnte bei beiden Stämmen ein einzelnes PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 450 bp amplifiziert werden. Dies bedeutet, dass beide Stämme kein Intron in der rDNA besitzen und somit dem Genotyp A zuzuordnen sind. D.h., dass beide Stämme dem putativ invasiveren Genotyp angehören (Karahan *et al.*, 2004).

### 3.2.3 Vergleichende Genomhybridisierungen

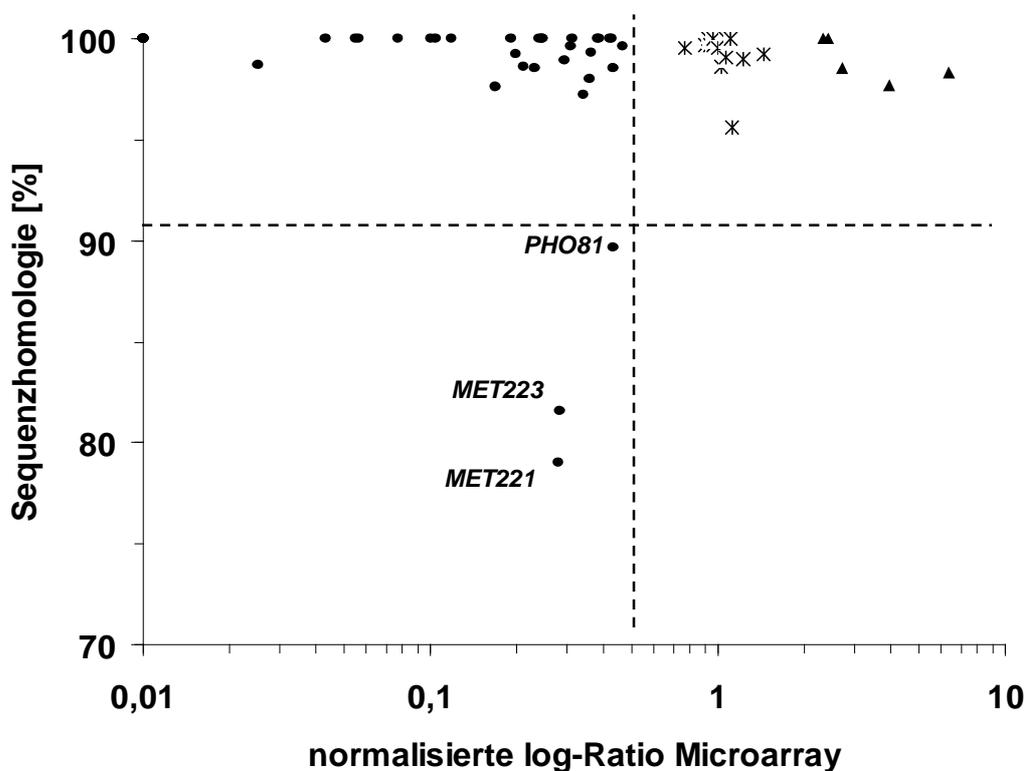
Um genotypische Unterschiede zwischen den beiden Stämmen SC5314 und ATCC10231 in einem größeren Maßstab analysieren zu können, wurden die beiden Stämme einer vergleichenden Genomhybridisierung (*comparative genome hybridisation*, CGH) mit Hilfe von Microarrays unterzogen. Vergleichende Genomhybridisierungen sind eine gute Methode um Unterschiede oder konservierte Gene in Genomen aufzuspüren. Sie wurde bereits eingesetzt um z.B. gutartige von bösartigen Tumoren zu unterscheiden (Weiss *et al.*, 2003) oder konservierte Gene zwischen Mensch und Rind zu identifizieren (Adjaye *et al.*, 2004). Aber auch zur Charakterisierung bakterieller Genome (Fukiya *et al.*, 2004) und zur Charakterisierung unterschiedlicher *S. cerevisiae* Stämme (Daran-Lapujade *et al.*, 2003) wurden CGHs bereits erfolgreich eingesetzt. Schließlich wurden die hier verwendeten *C. albicans* Microarrays für die Identifikation von fehlenden und divergenten Genen in *C. dubliniensis* verwendet (Moran *et al.*, 2004).

Für die Hybridisierung musste die gDNA, welche möglichst ungeschert isoliert wurde, in kleinere Fragmente geteilt werden. Moran *et al.* hatten bereits gezeigt, dass es keinen Einfluss auf die Hybridisierung hat, ob die DNA durch Ultraschall geschert wird oder ob man die DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen restringiert (Moran *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde die gDNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten, welche nur vier Basen als Erkennungssequenz benötigen. Dadurch entstehen kleinere Fragmente als mit Enzymen, welche sechs Basen als Erkennungssequenz benötigen. Neben dem eingesetzten Enzym *RsaI*, welches in der Sequenz 5'-GTAC-3' schneidet, wurde auch das Enzym *Tru1I* (*MseI*) eingesetzt. Das letzere Enzym schneidet DNA an der Stelle 5'-TTAA-3'. Da das Genom von *C. albicans* einen hohen AT-Gehalt aufweist (Lloyd und Sharp, 1992) konnte durch die Wahl dieser beiden Enzyme die gDNA in Stücke von ca. 200-2.000 Basenpaaren geschnitten werden.

Die PCR-Produkte der *C. albicans* Microarrays basieren auf der Genomsequenz des Stamms SC5314. Deshalb wurden nach der Markierung der geschnittenen DNA und der Hybridisierung bei der Analyse die Gene ausgewählt, die eine mindestens 2-fach schwächere Hybridisierung mit DNA von ATCC10231 als mit DNA von SC5314 zeigten. Aus diesen 37 Genen wurde der Abschnitt, welcher für die Hybridisierung verantwortlich ist mittels PCR aus beiden Stämmen amplifiziert und sequenziert.

Anschließend wurden die Sequenzen auf Unterschiede zwischen SC5314 und ATCC10231 hin untersucht. Da auch einige Gene ein stärkeres Signal mit DNA von ATCC10231 als mit DNA von SC5314 zeigten, wurden auch hier 5 Gene auf Sequenzebene analysiert. Zusätzlich konnten noch 15 bereits beschriebene Gene aus ATCC10231 in die Analyse mit einbezogen werden.

Abbildung 3.14 zeigt einen Plot der Sequenzhomologien gegen die normalisierten log-Ratios der Hybridisierungs-Signale. Eine Liste aller analysierten Gene ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A2).



• schwaches Signal ATCC10231 ▲ starkes Signal ATCC10231 \* publiziert ATCC10231

**Abb. 3.14:** Vergleich der Microarray log-Ratios mit der Sequenzhomologie zu SC5314 der analysierten Gene aus ATCC10231. Neben den publizierten Genen aus ATCC10231 wurden 37 schwächer hybridisierende Genabschnitte und 5 stärker hybridisierende Genabschnitte mit den entsprechenden Abschnitten aus SC5314 verglichen. Die gestrichelten Linien markieren eine log-Ratio von 0,5 bzw. eine Sequenzhomologie von 90 %.

Wie die obige Abbildung zeigt, liegen die Sequenzhomologien bei fast allen untersuchten Genabschnitten bei über 95 % unabhängig von der log-Ratio der Microarray-Signale. Insbesondere die bereits publizierten Gene aus ATCC10231

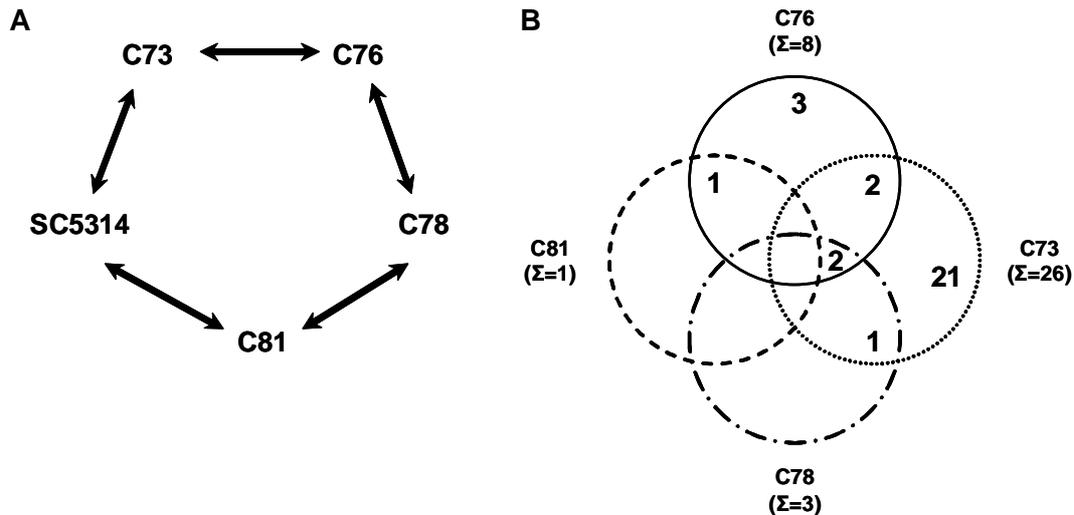
zeigen weder in der Sequenzhomologie noch in der log-Ratio signifikante Unterschiede zu SC5314.

Dennoch konnten drei Genabschnitte aus ATCC10231 identifiziert werden, die sowohl eine signifikant schwächere Hybridisierung auf dem Microarray aufwiesen (log-Ratio < 0,5) als auch eine signifikant niedrigere Sequenzhomologie (unter 90 %) zu SC5314 zeigten. Bei den drei identifizierten Genen handelte es sich um *PHO81*, einem Gen, welches für einen Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor aus dem Phosphat-Metabolismus codiert, und um *MET221* und *MET223*, zwei Genen, die für eine Ser/Thr-Proteinkinase der Methionin-Biosynthese codieren. *MET221* und *MET223* kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da für diese beiden Gene bereits gezeigt werden konnte, dass sie in einer hochpolymorphen Region des *C. albicans* Genoms liegen (Jones *et al.*, 2004). Weiterhin ist anzumerken, dass diese beiden Gene in der aktuellsten Genomversion (Assembly 20) als *HAL22* (*MET221*) bzw. *HAL21* (*MET223*) geführt werden.

Eine weitere Auffälligkeit ergab sich aus der Tatsache, dass 11 der untersuchten Genabschnitte für Proteine eines Retrotransposons codieren. Ein aktives Retrotransposon konnte bereits in *C. albicans* nachgewiesen werden (Holton *et al.*, 2001). Weiteren 21 Genen konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden, wonach die Möglichkeit besteht, dass diese Gene falsch im Genom identifiziert worden sind.

### 3.2.4 Vergleich mit Patientenisolaten

Die bisher beschriebene vergleichende Genomhybridisierung befasste sich nur mit dem invasiven Stamm SC5314 und dem nicht-invasiven Stamm ATCC10231. Um die Bedeutung der gefundenen Unterschiede besser evaluieren zu können, wurden weitere *C. albicans* Isolate mittels CGH analysiert. Bei den Isolaten handelte es sich um Patientenisolaten, die freundlicherweise von Dr. Julian Naglik vom King's College in London zur Verfügung gestellt wurden. C73 ist ein Isolat, welches von einem Patienten mit einer oralen Candidose stammt. Isolat C76 stammt von einem Patienten, der zwar *C. albicans* oral trägt, aber nicht erkrankt ist (oraler Träger). Bei den letzten beiden Isolaten stammt das eine (C78) aus einer Vulvovaginitis und das zweite Isolat (C81) stammt auch aus der Vagina, wobei die Patientin aber wiederum nicht erkrankt ist (Trägerisolat).



**Abb. 3.15:** (A) Experimentelles Design der Patientenisolat-CGH. Die einzelnen Isolate wurden in einem Kreisdesign miteinander verglichen. Dabei bedeutet eine Pfeilspitze eine gDNA-Markierung mit Cy3, so dass sich für jeden einzelnen Vergleich zwei Hybridisierungen ergaben (Farbtausch). (B) Venn-Diagramm der nicht-hybridisierenden Gene der einzelnen Patientenisolat (im Vergleich zu SC5314).

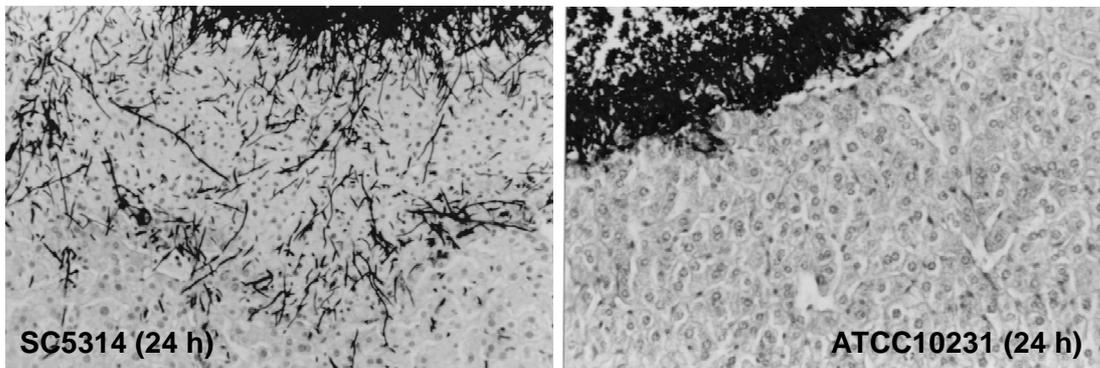
Die Analyse der Patientenisolat mittels CGH wurde anders durchgeführt als bei dem obigen Einzelvergleich zwischen SC5314 und ATCC10231. Die Isolate wurden auch mit SC5314 verglichen, jedoch in einem kreisförmigen experimentellen Design (Abb. 3.15 A). Die Auswertung der gewonnenen Daten konzentrierte sich anschließend nur auf diejenigen Gene, die in beiden Replikaten kein Signal aufwiesen. Dies war möglich geworden, da mit den obigen Ergebnissen bereits gezeigt werden konnte, dass die Hybridisierungsstärke nicht alleine von der Sequenz abzuhängen scheint. Abbildung 3.15 B zeigt ein Venn-Diagramm, welches die Überlappungen der nicht-hybridisierenden Gene aus den einzelnen Isolat zeigt. Die vollständige Liste mit allen Gennamen aus den einzelnen Isolat ist der Tabelle A3 im Anhang zu entnehmen.

Aus der Abbildung 3.15 B geht hervor, dass die beiden oralen Isolat die höchste Anzahl an nicht-hybridisierenden Genen aufwiesen. Dabei zeigte das Isolat C73 aus einer oralen Candidose mit 26 Genen die mit Abstand größte Anzahl. Insgesamt gab es nur wenige Gene, die in zwei oder mehr Isolat keine Hybridisierung zeigten. Insbesondere die beiden Gene *Cirt* und *orf19.134* kamen in drei Isolat nicht vor. Bei *Cirt* handelt es sich allerdings wieder um ein Gen, welches vermutlich für eine Transposase codiert (siehe CGH SC5314/ATCC10231). *Orf19.134* ist ein Gen mit unbekannter Funktion. Insgesamt waren von den gefundenen 30 unterschiedlichen Genen 16 mit unbekannter Funktion. Im Vergleich zur CGH zwischen SC5314 und

ATCC10231 konnte bei den Patientenisolaten jedoch nur ein Gen (*Cirt*) identifiziert werden, welches nicht-hybridisierte und mit dem Retrotransposon aus *C. albicans* assoziiert war (vgl. oben).

### 3.3 Die intraperitoneale Infektion von Mäusen

Nach den phänotypischen und genotypischen Untersuchungen der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 folgte eine Transkriptomanalyse während einer intraperitonealen Infektion von Mäusen. Um an infiziertes Gewebe zu gelangen wurden weibliche Balb/C-Mäuse mit einer sublethalen Dosis der beiden *C. albicans* Stämme infiziert und es wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen: nach 30 min erfolgte eine Lavage der Bauchhöhle mit anschließender Pelletierung der Pilzzellen, nach 3 h und 5 h wurde den Mäusen die Leber entfernt und für histologische Aufnahmen fixiert bzw. für die Erstellung der Transkriptionsprofile kleine infizierte Leberstückchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Marianne Kretschmar und Dr. Thomas Nichterlein aus dem Universitätsklinikum Mannheim.



**Abb. 3.16:** Intraperitoneale Infektion der Leber von Mäusen mit *C. albicans* SC5314 und ATCC10231. 24 h nach der Infektion war SC5314 in tiefe Gewebsschichten der Leber eingedrungen. ATCC10231 war hingegen nicht in der Lage die Organkapsel zu durchdringen.

Die Zeitpunkte wurden so gewählt, da hiermit verschiedene Phasen der Infektion untersucht werden konnten. Nach 30 min hatten sich die Pilzzellen an eine neue Umgebung angepasst, nach 3 h waren die Zellen an die Organoberflächen adhäriert und nach 5 h schließlich hatten die ersten Hyphen die Leberkapsel durchbrochen und waren in tieferes Gewebe eingedrungen (persönliche Mitteilung M. Kretschmar

und (Kretschmar *et al.*, 1999a; Felk *et al.*, 2002)). Diese Studien galten nur für SC5314. Stamm ATCC10231 war zwar in der Lage an die Organoberflächen zu adhären, konnte aber nicht die Kapsel durchdringen. Dies war auch 24 h nach der Infektion der Fall (Abb. 3.16). ATCC10231 konnte jedoch über das Blut Organe wie das Herz, die Lunge oder die Nieren befallen (Kretschmar *et al.*, 1999a). Wie der Stamm allerdings ins Blut gelangt ist unklar.

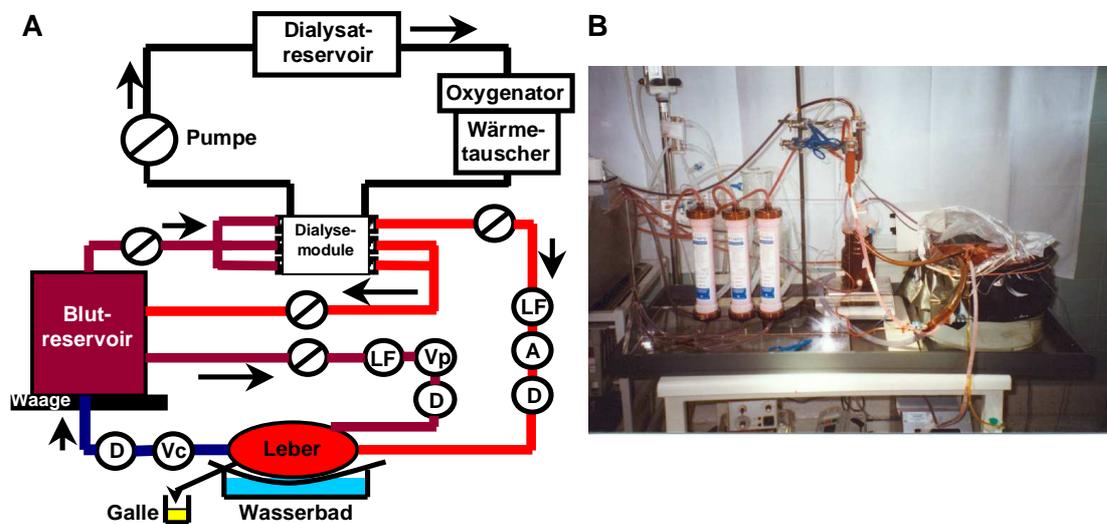
### 3.4 Die *ex vivo* perfundierte Leber als neues Infektionsmodell

Da das verwertbare Material an infiziertem Lebergewebe aus der Maus begrenzt war, wurde ein Infektionssystem etabliert, bei dem ausreichend Material für die Transkriptionsprofile erhalten werden konnte. Hierfür eignete sich besonders eine *ex vivo* hämoperfundierte Schweineleber, welche aufgrund ihrer großen Oberfläche eine Applikation von größeren Mengen Pilzmaterial erlaubte. Die Etablierung der perfundierten Leber als Infektionsmodell erfolgte in Zusammenarbeit mit Hilde Reed, Dr. Michael Meissler und Dr. Christian Grosse-Siestrup von den tierexperimentellen Einrichtungen des Virchow Krankenhauses der Charité in Berlin (Thewes *et al.*, 2007).

#### 3.4.1 Der Aufbau

In der Literatur sind bereits viele Perfusionssysteme beschrieben, so dass sich der Aufbau dieses Systems an bereits publizierten Systemen anlehnte (Grosse-Siestrup *et al.*, 2002b; Grosse-Siestrup *et al.*, 2004; Nagel *et al.*, 2005). Im Wesentlichen bestand der Aufbau aus einem Blutkreislauf und einem Dialysatkreislauf, welche über Dialysemembranen miteinander in Verbindung standen (Abb. 3.17). Der Dialysatkreislauf war ein einfacher Kreislauf, bei dem das Dialysat mit Sauerstoff angereichert und durch einen Wärmetauscher erwärmt wurde. Über die Dialysemembranen konnte der Sauerstoff und die Wärme an das Blut abgegeben werden. Der Blutkreislauf bestand aus zwei Untereinheiten: dem sauerstoffreichen Blut, welches direkt in die Arteria hepatica gepumpt wurde und einem Kreislauf mit sauerstoffreduziertem Blut (Gemisch aus arteriellem und venösen Blut), welches in

die Pfortader der Leber gepumpt wurde (Abb. 3.17 A). Geschlossen wurde der Kreislauf durch das sauerstoffarme Blut der Vena cava.



**Abb. 3.17:** (A) Schematischer Aufbau des Leberperfusionssystems. Sauerstoffreiches Blut ist hellrot dargestellt, sauerstoffarmes Blut blau. Sauerstoffreduziertes Blut für den Pfortaderkreislauf ist dunkelrot gekennzeichnet. Der Dialysatkreislauf ist schwarz dargestellt. Pfeile geben die Flussrichtung wieder. LF = Luftfalle, D = Druckmessung, A = arterielle Blutprobenentnahme, Vp = Pfortader-Blutprobe, Vc = venöse Blutprobenentnahme. (B) Fotografie des Perfusionssystems.

### 3.4.2 Etablierung des Systems und Infektion mit *C. albicans*

Bevor eine Infektion mit den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 erfolgen konnte, wurde das Perfusionssystem zunächst einmal mit Hilfe von vier nicht-infizierten Lebern, welche über einen Zeitraum von drei Stunden perfundiert wurden, etabliert.

#### 3.4.2.1 Perfusionsparameter

Für die Leberperfusion wurden die Schweinelebern den Tieren unter Narkose entnommen, kanüliert und direkt in das Perfusionssystem eingesetzt. Die Perfusionsparameter wurden wie im Material und Methoden Teil beschrieben konstant gehalten und es wurden alle 30 min Blut- und Dialysatproben dem System entnommen und analysiert. Nach der Etablierung des Systems wurden vier weitere Lebern simultan mit SC5314 und ATCC10231 durch das Auflegen von pilzgetränkten Baumwollplättchen infiziert (Kvaal *et al.*, 1999) und für 12 h perfundiert. Tabelle 3.2 gibt die beiden wichtigsten Funktionsdaten der Leber, die Galleproduktion und den

Sauerstoffverbrauch, wieder. Zusätzlich enthält die Tabelle noch die Gewichtszunahme während der Perfusion.

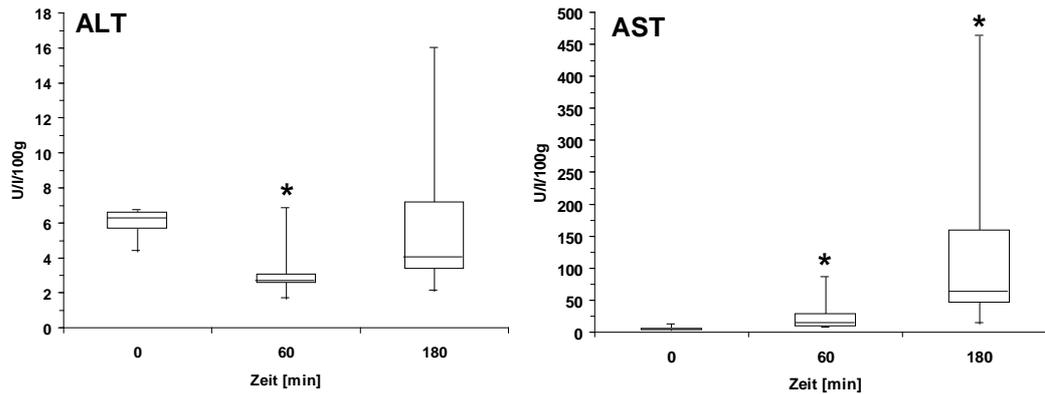
**Tabelle 3.2:** Funktionsparameter der Leberperfusion. Es wurden die Parameter der vier infizierten Lebern ausgewertet.

Parameter	Zeit [min]					
	60	180	300	420	540	720
Galleproduktion [ml/h]	2.55 ± 3.88	3.13 ± 0.75	1.99 ± 1.20	1.43 ± 1.13	2.70 ± 1.61	2.35 ± 0.85
Sauerstoffverbrauch [µmol/min/100 g]	81.34 ± 16.99	87.12 ± 11.56	81.91 ± 12.30	68.26 ± 27.78	77.97 ± 22.06	66.58 ± 24.83
Gewichtszunahme [%]	n.a.	11.65 ± 11.03*	n.a.	n.a.	n.a.	16.98 ± 21.85

\* = Gewichtszunahme der vier Lebern, die für die Etablierung des Systems verwendet wurden; n.a. = nicht anwendbar

Wie der Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, haben die infizierten Lebern über den gesamten Perfusionszeitraum konstant Galle produziert und Sauerstoff verbraucht. Hierbei gab es keinen signifikanten Unterschied in den ersten drei Stunden der Perfusion im Vergleich zu den vier Lebern, die für die Etablierung des Systems eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Der Tabelle ist weiterhin zu entnehmen, dass die Gewichtszunahme der Leber nach zwölfstündiger Perfusion nicht signifikant höher lag als nach dreistündiger Perfusion.

Neben den Funktionsparametern ist die Bestimmung der Schädigung des Organs während der extrakorporalen Perfusion von Bedeutung. Neben der Perfusion selbst kommt es vor allem in dem Zeitraum zu Schädigungen des Lebergewebes, in dem die Leber dem Tierkreislauf entnommen und kanüliert wird. Diese Ischämie, die Phase ohne Blutversorgung, führt zu mangelnder Versorgung der Leberzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen wodurch das Gewebe geschädigt wird. Um die Schädigung des Lebergewebes zu messen, wurden die Blutkonzentrationen der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) gemessen. Diese beiden Enzyme kommen vorwiegend in Leberzellen vor und eine Freisetzung der Enzyme in das Blut ist ein anerkannter Marker zur Bestimmung von Leberschäden (Giannini *et al.*, 2005). Abbildung 3.18 zeigt die Konzentrationen der beiden Markerenzyme im Blut während einer dreistündigen Perfusionsdauer.



**Abb. 3.18:** Box-Plot der Konzentration an Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Perfusionsblut während dreistündiger Perfusion von  $n = 8$  Lebern. \* = signifikanter Unterschied zum Ausgangswert mit  $P < 0,05$ .

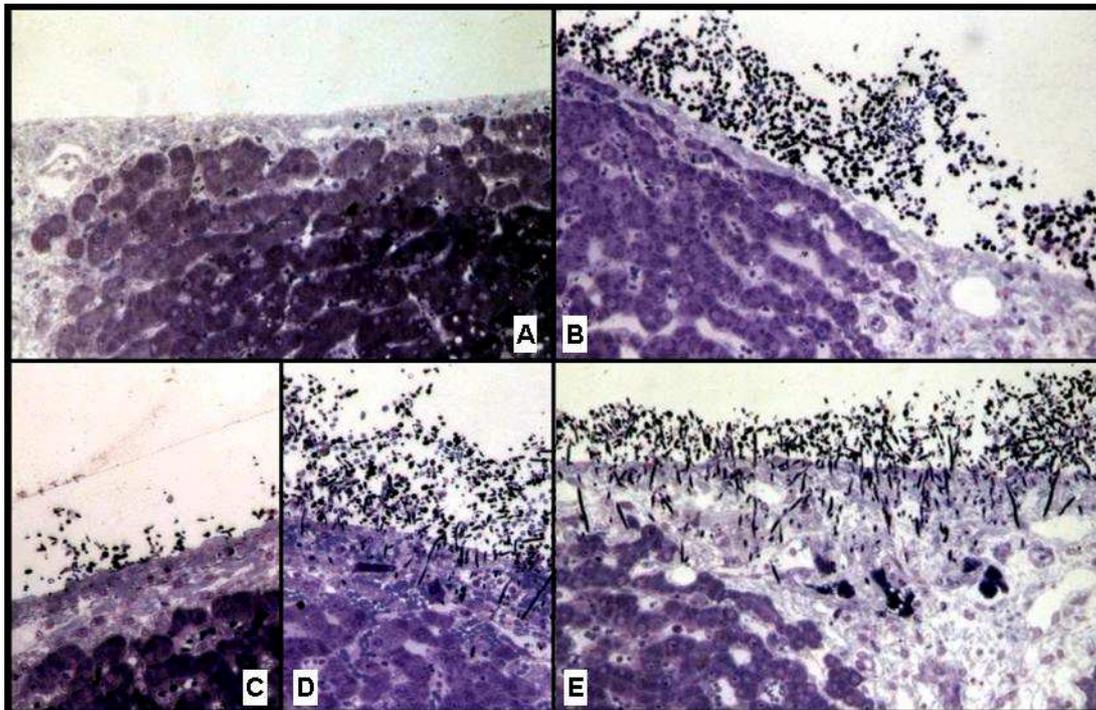
In der Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse aller acht verwendeten Lebern zusammengefasst. Dabei wurden die Enzymkonzentrationen der vier Langzeitperfusionen der Infektion nur über die ersten drei Stunden verfolgt, da ab der dritten Stunde Leberproben für die Histologie und für die RNA-Isolation entnommen wurden. Dafür war es notwendig die Leberoberfläche mit einem Skalpell zu verletzen, was automatisch zu einem Anstieg der Enzymkonzentrationen im Blut führte (Daten nicht gezeigt). Somit konnte zu einem späteren Zeitpunkt keine Aussage über die Leberschädigung durch Ischämie und Perfusion getroffen werden. Wie die obige Abbildung zeigt, fällt die ALT-Konzentration zunächst ab, um nach drei Stunden wieder den Ausgangswert zu erreichen. Im Gegensatz dazu steigt die AST-Konzentration im gesamten zeitlichen Verlauf stark an, was auf eine Schädigung des Lebergewebes hindeutet.

#### 3.4.2.2 Histologie des Infektionsverlaufs

Anhand der obigen Perfusionsparameter konnte gezeigt werden, dass eine Perfusion über 12 h die Leber nicht zu stark schädigte. Auch das histologische Bild der Leber nach einer zwölfstündigen Perfusion bestätigte die gewonnenen Daten (Abb. 3.19 A). Die Leberoberfläche war intakt und die Hepatocyten zeigten keine sichtbaren Schädigungen.

Das Perfusionsmodell wurde anschließend dazu verwendet Infektionen mit den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 durchzuführen und den Verlauf der Infektion mit der etablierten intraperitonealen Infektion der Maus zu

vergleichen. Dabei wurden beide Stämme simultan auf eine Schweineleber appliziert und es wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Lebermaterial für die Histologie entnommen. Wie die Abbildung 3.19 zeigt, war ATCC10231 auch in dem Perfusionsmodell nach 10 h nicht-invasiv (Abb. 3.19 B). Dies ist vergleichbar mit der intraperitonealen Infektion der Maus. SC5314 hingegen zeigte zwar nach 5 h Perfusion noch keine invasiven Hyphen (Abb. 3.19 C), drang jedoch nach 7 h oberflächlich in die Leberkapsel ein und erreichte nach 10 h auch tiefer gelegene Hepatocyten (Abb. 3.19 D+E). Vergleicht man diesen zeitlichen Verlauf mit dem einer intraperitonealen Mausinfektion (siehe 3.3), so ist zu erkennen, dass der Beginn der Invasion in die Schweineleber im Vergleich zur Mäuseleber verzögert war. Die Verzögerung im Vergleich zur Maus betrug in der *ex vivo* Perfusion ca. 2-4 Stunden.



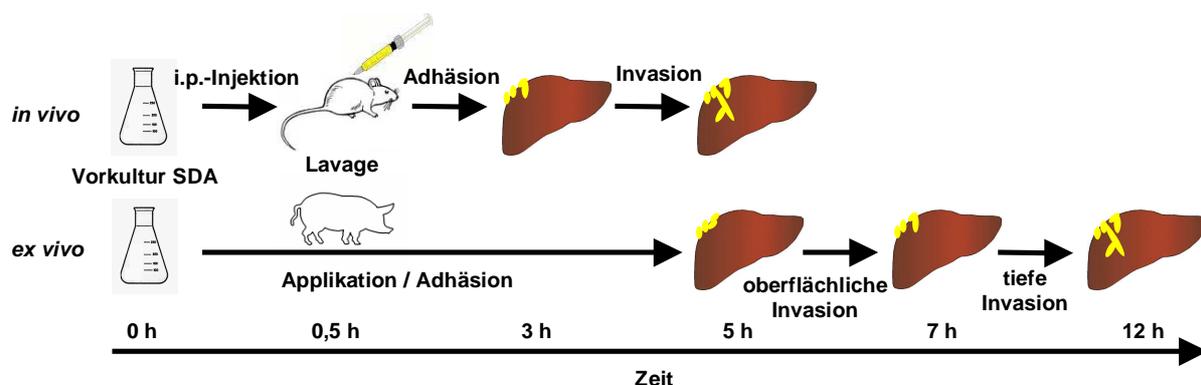
**Abb. 3.19:** Histologie der *ex vivo* Leberperfusion. **(A)** Nicht-infizierte Leberoberfläche nach 12 h Perfusion. **(B)** Infizierte Leberoberfläche mit ATCC10231 nach 10stündiger Inkubation. **(C-E)** Infizierte Leberoberfläche mit SC5314 nach 5 h (C), 7 h (D) bzw. 10 h (E).

Da die *ex vivo* hämoperfundierte Leber erfolgreich als Infektionsmodell für *C. albicans* etabliert wurde, wurden auch Leberproben für die Erstellung von Transkriptionsprofilen zu bestimmten Zeitpunkten (s. u.) entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -70 °C gelagert.

### 3.5 *In vivo* und *ex vivo* Transkriptionsprofile

Die phänotypischen und genotypischen Untersuchungen der beiden Stämme SC5314 und ATCC10231 zeigten bis auf die deutlich geringere Invasivität von ATCC10231 nur wenige Unterschiede. Für eine molekularbiologische Charakterisierung der Invasivität von *C. albicans* wurden daher *in vivo* und *ex vivo* Transkriptionsprofile von Pilzzellen während einer Invasion erstellt. Dabei wurden zwei verschiedene Strategien angewendet: (i) die Identifizierung von Genen, welche im Verlauf einer *in vivo* bzw. *ex vivo* Infektion exprimiert werden und (ii) die Ermittlung der Unterschiede in der Genexpression zwischen dem invasiven Stamm SC5314 und dem nicht-invasiven Stamm ATCC10231.

Die *in vivo* Transkriptionsprofile wurden aus infizierten Mäuselebern nach einer intraperitonealen Infektion erstellt (siehe 3.3), die *ex vivo* Profile aus infizierten Proben der hämoperfundierten Schweineleber (siehe 3.4). Die Zeitpunkte der Probenentnahme wurden dabei nach dem histologischen Bild der Infektion gewählt. Für die *in vivo* Profile wurde die erste Probe 30 min nach der Infektion durch eine Lavage der Bauchhöhle gewonnen, um die Anpassung an das neue Milieu verfolgen zu können. Die weiteren Proben wurden 3 h (Adhäsion der Pilzzellen an die Leber) und 5 h (beginnende Invasion in die Leber) nach Inokulation gewonnen. Für die *ex vivo* Transkriptionsprofile wurden Leberbiopsien nach 5 h (Adhäsion), 7 h (beginnende Invasion) und 12 h (tiefe Invasion) gewonnen. Abbildung 3.20 zeigt das experimentelle Design der Probenentnahme. Als Vergleich wurden bei beiden Infektionsmodellen das Transkriptionsprofil der SDA-Vorkultur erstellt (Zeitpunkt 0 h).



**Abb. 3.20:** Experimentelles Design der Infektionen und Probenentnahmen *in vivo* bzw. *ex vivo*. Für die *in vivo* Transkriptionsprofile wurden nach der intraperitonealen Infektion der Maus Proben nach 0,5 h (Lavage), 3 h und 5 h (beides Leberbiopsie) gewonnen. Die *ex vivo* Probenentnahme erfolgte nach 5 h, 7 h und 12 h durch eine Biopsie der infizierten Schweineleber.

Die Analyse der Transkriptionsprofile basierte auf den folgenden Hypothesen: (i) Es wurde erwartet, dass die Gene, die für die Invasion notwendig sind, exprimiert werden sobald die Pilzzellen in das Gewebe eindringen, aber nicht, wenn die Pilzzellen noch keinen Kontakt zum Organ haben. (ii) Zumindest einige Gene, die für die Invasion notwendig sind, sollten im invasiven Stamm SC5314 zwischen 3 h und 5 h *in vivo* bzw. zwischen 7 h und 12 h *ex vivo* exprimiert werden, im nicht-invasiven Stamm ATCC10231 jedoch nicht.

Die *in vivo*- bzw. *ex vivo*-Transkriptionsprofile wurden nach Murillo *et al.* zunächst separat horizontal und anschließend kombiniert vertikal analysiert (Murillo *et al.*, 2005). Zusätzlich wurden einzelne Expressionsprofile von bereits beschriebenen Genen manuell untersucht. Bei der horizontalen Analyse wurden die Transkriptionsprofile der beiden Stämme einzeln im zeitlichen Verlauf analysiert (0 h im Vergleich zu 0,5 h, 3 h, 5 h), so dass das Expressionsschema während der Invasion verfolgt werden konnte. Durch die separate Analyse der beiden Stämme kam es hierbei zu unterschiedlichen Anzahlen an analysierten Genen. Bei der vertikalen Analyse gab es keine Unterschiede in der Anzahl, da hier die Analyse der Profile für beide Stämme kombiniert wurde. Bei diesem Ansatz konnten die einzelnen Zeitpunkte der Infektion innerhalb der Stämme direkt miteinander verglichen werden (z.B. 0,5 h SC5314 mit 0,5 h ATCC10231).

Schließlich wurden auch die Transkriptionsprofile der *in vivo*- und der *ex vivo*-Infektion miteinander verglichen.

### 3.5.1 *In vivo* Transkriptionsprofile

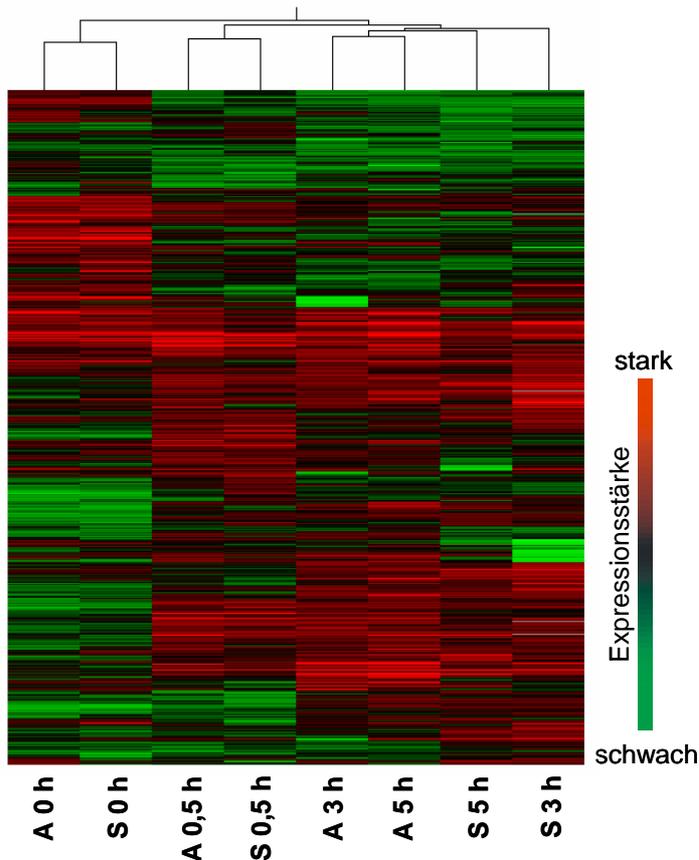
Wie in der Abbildung 3.20 dargestellt, wurden für die *in vivo* Transkriptionsprofile Proben nach 0,5 h, 3 h und 5 h gewonnen. Diese wurden dann mit dem Transkriptionsprofil der Vorkultur (0 h) verglichen. Es bestand dabei die Gefahr, dass es aufgrund der heterogenen RNA-Population (*Candida*-RNA und Maus-RNA) zu Kreuzhybridisierungen der Maus-RNA auf den eingesetzten *C. albicans* Microarrays kommen könnte. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, genügend Pilz-RNA aus den Leberproben zu gewinnen.

Um den ersten Punkt auszuschließen, wurde ein *C. albicans* Microarray mit reiner markierter Maus-RNA hybridisiert. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen entsprachen dabei denen reiner *Candida*-RNA. Das Bild des eingescannten

Microarrays machte deutlich, dass es unter den gegebenen Bedingungen nicht zu signifikanten Kreuzhybridisierungen der Maus-RNA mit dem *C. albicans* Microarray kam (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutete gleichzeitig, dass in einem heterogenen RNA-Gemisch der *C. albicans* Microarray spezifisch mit *Candida*-RNA hybridisiert.

Für eine optimale Hybridisierung der Microarrays benötigt man ca. 30-50 µg totale RNA bzw. 1-2 µg mRNA bzw. cRNA. Die RNA-Ausbeute der infizierten Leberstückchen lag jedoch deutlich unter 30 µg totaler RNA. Aus diesem Grund wurde die RNA linear amplifiziert und gleichzeitig markiert. Dieses Verfahren erlaubte es, mit einem Ausgangsmaterial von nur 50 ng totaler RNA zu starten und dennoch genügend markierte cRNA für eine Hybridisierung zu erhalten. Die Menge an Ausgangs-RNA wurde semiquantitativ mit Hilfe einer Eichreihe mit bekannten RNA-Konzentrationen bestimmt. Dazu wurde 1 µl Proben-RNA einer RT-PCR mit *EFB1*- bzw. *ACT1*-Primern unterzogen und mit einer Eichreihe von 500 ng, 50 ng und 5 ng totaler *Candida*-RNA verglichen. So konnte ebenfalls das Verhältnis zwischen Maus-RNA und *Candida*-RNA abgeschätzt werden. Es zeigte sich nämlich während der ersten Hybridisierungen, dass ein Verhältnis >5:1 (Maus:*Candida*) die Hybridisierung beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden für die Auswertung auch nur Organproben verwendet, deren Verhältnis von Maus- zu *Candida*-RNA nicht größer als 5:1 war.

Nach diesen Vorarbeiten wurden von jedem Stamm und jedem Zeitpunkt (0 h, 0,5 h, 3 h und 5 h) jeweils zwei infizierte Organe (biologische Duplikate) analysiert. Zunächst wurden dazu die einzelnen Transkriptionsprofile kombiniert analysiert und die Profile wurden anschließend hierarchisch geclustert. Aus dieser kombinierten Analyse ergaben sich 1.258 Gene, deren Expression zuverlässig in mindestens drei von vier Zeitpunkten in beiden Stämmen detektiert werden konnte. Diese Gene ergaben die in Abbildung 3.21 dargestellt hierarchische Verteilung.



**Abb. 3.21:** Hierarchische Clusteranalyse (Eisen *et al.*, 1998) der verschiedenen *in vivo* Infektionszeitpunkte von SC5314 (S) und ATCC10231 (A). Es flossen 1.258 Gene in die Analyse ein.

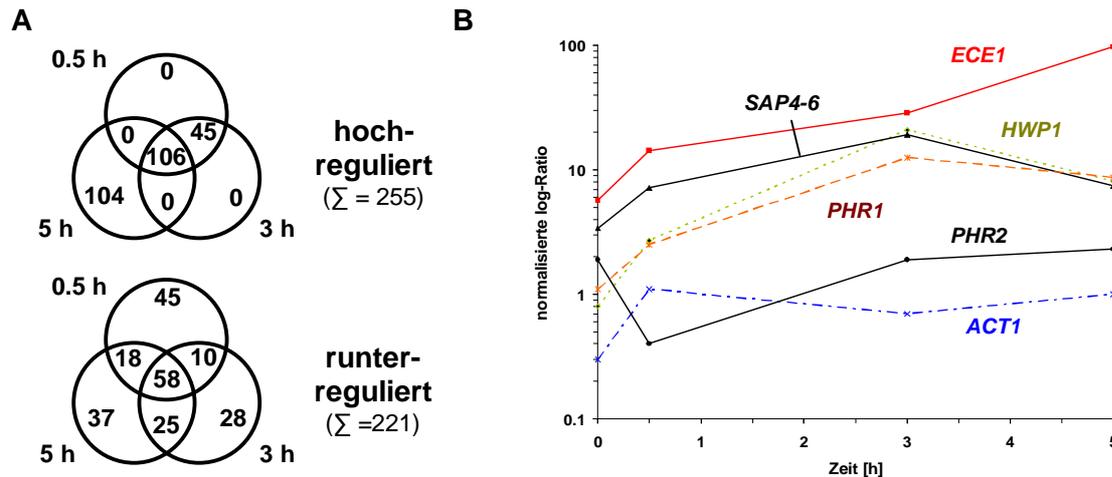
Wie zu erkennen ist, waren sich die Transkriptionsprofile der Vorkulturen der beiden Stämme SC5314 und ATCC10231 sehr ähnlich. Auch 30 min nach der Infektion waren sich die Profile noch ähnlich, distanzierten sich allerdings bereits klar von den Profilen der Vorkultur. Dies entsprach den Erwartungen, dass die Genexpression in der Vorkultur und in der frühen Phase der Infektion im invasiven und nicht-invasiven Stamm nicht signifikant unterschiedlich sind. Anders verhielt es sich mit den Expressionsprofilen in den späteren, invasiven Stadien der Infektion. Hier zeigte sich den Erwartungen entsprechend eine klare Trennung der Profile des invasiven Stamms SC5314 und des nicht-invasiven Stamms ATCC10231. Dabei waren zusätzlich das 3 h- und 5 h-Profil von ATCC10231 ähnlicher als die entsprechenden Profile von SC5314 (Abb. 3.21).

Neben dieser generellen Analyse der *in vivo* Transkriptionsprofile werden im Folgenden zunächst beide Stämme einzeln in einer horizontalen Analyse betrachtet.

### 3.5.1.1 Horizontale in vivo Analyse des Stamms SC5314

Für die horizontale Analyse wurden die Expressionsprofile von Stamm SC5314 separat untersucht. Es konnten 787 Gene identifiziert werden, die in mindestens drei von vier Zeitpunkten eine detektierbare Expression zeigten. Unter diesen Genen waren 255 die eine mindestens 2-fach stärkere Expression in einem der drei Infektionszeitpunkte im Vergleich zur Vorkultur zeigten. Diese Gene konnten klar in drei verschiedene Gruppen mittels eines Venn-Diagramms unterteilt werden: (A) Gene, die zu allen Zeitpunkten hochreguliert waren, (B) Gene, die nur in den frühen Zeitpunkten 0,5 h und 3 h hochreguliert waren und (C) Gene, die nur 5 h nach der Infektion stark exprimiert waren (Abb. 3.22 A). Diese Aufteilung entsprach den erwarteten Infektionsstadien: (A) Adaption an ein neues Milieu, (B) Adhäsion der Pilzzellen an die Organoberfläche und (C) Invasion der Pilzzellen. Es wurden zusätzlich 221 Gene identifiziert, deren Expression in mindestens einem der drei Infektionszeitpunkte 2-fach niedriger war als in der Vorkultur. Im Gegensatz zu den hochregulierten Genen konnten diese aber nicht in spezifische Untergruppen eingeteilt werden (Abb. 3.22 A).

Die hochregulierten Gene in den drei Untergruppen wurden anschließend in funktionelle Kategorien basierend auf dem MIPS-System (Guldener *et al.*, 2005) eingeteilt. Dabei zeigte sich, wie in Tabelle 3.3 zu erkennen ist, dass ein großer Teil (29 %) der hochregulierten Gene zu allen Zeitpunkten (Gruppe A) in den funktionellen Gruppen „Metabolismus“ und „Energie“ lag. Die Expression dieser Gene scheint eine Anpassung auf die Nährstoffverhältnisse der Bauchhöhle und des Lebergewebes zu sein. Insbesondere die starke Expression von *PFK2*, *PDA1*, *PDX1*, *KGD1* und *KGD2* deuteten an, dass Stamm SC5314 Zucker als Kohlenstoffquelle benutzt. *PFK2* codiert nämlich für die Phosphofruktokinase, einem Schlüsselenzym der Glykolyse. *PDA1* und *PDX1* codieren Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase des Acetyl-CoA Biosynthesewegs und *KGD1* und *KGD2* codieren für Schlüsselenzyme des Citratzyklus. Andererseits lag wahrscheinlich auch eine Subpopulation an *C. albicans*-Zellen vor, die Glukosemangel hatten, da auch *PCK1*, welches für ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, codiert, hochreguliert war.



**Abb. 3.22:** *In vivo* exprimierte Gene SC5314. **(A)** Venn-Diagramm der hoch- bzw. runterregulierten Gene zu den einzelnen Zeitpunkten der Infektion im Vergleich zur Vorkultur. **(B)** Expressionsprofil *in vivo* von ausgesuchten Genen auf der Basis von Microarray-Analysen.

Weitere Gene, die zu allen drei Infektionszeitpunkten stark exprimiert waren, umfassten die beiden Kategorien „Protein-Katabolismus und –Sortierung“ und „zellulärer Transport“. Auch hier ist anzunehmen, dass die verstärkte Expression in diesen Gengruppen im Zusammenhang mit der generellen Adaption an das veränderte Milieu steht.

Eine andere Beobachtung war, dass Stress-assoziierte Gene wie *HSP78*, *HSP90* und *DDR48* zu allen Zeitpunkten stärker exprimiert waren als in der Vorkultur. Obwohl die *C. albicans* Zellen somit Stress ausgesetzt zu sein schienen, war der Stress weder oxidativer noch nitrosativer noch osmotischer Natur. Diese Aussage lässt sich treffen, da die Markergene für diese drei Stresstypen *CAT1* (Katalase), *YHB1* (Flavohämoglobin) und Gene, die für Proteine des Glycerol-Metabolismus codieren, keine erhöhte Expression im Vergleich zur Vorkultur zeigten.

Schließlich konnten unter den stark exprimierten Genen zu allen Zeitpunkten auch Virulenz-assoziierte Gene wie *SAP5*, *ALS3* und *PHR1* ausgemacht werden (siehe unten und Abb. 3.22 B). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von sogenannten *Housekeeping*-Genen wie *ACT1*, welches für Actin codiert, über den gesamten Infektionszeitraum kaum Fluktuation zeigte (Abb. 3.22 B). Somit konnte *ACT1* als Kontroll-Gen angesehen werden.

**Tabelle 3.3:** Einteilung der 255 *in vivo* hochregulierten Gene aus SC5314 in funktionelle Kategorien (vgl. auch Abb. 3.22 A).

Kategorie	SC5314		
	Zeitpunkt		
	alle Zeitpunkte (A)	0,5 h und 3 h (B)	nur 5 h (C)
Metabolismus	18	7	14
Energie	14	4	6
Zellzyklus und DNA-Prozessierung	8	2	9
Transkription	8	3	10
Protein Synthese	4	6	7
Protein-Katabolismus und -Sortierung	17	5	9
zellulärer Transport	10	5	7
zelluläre Kommunikation	2	2	3
Zell-Rettung, Abwehr und Virulenz	5	1	6
Interaktion mit der Umwelt	-	2	1
Biogenese zellulärer Bestandteile	3	-	5
Zelldifferenzierung	3	-	-
Unbekannte Funktion (%)	14 (13)	8 (18)	27 (26)
<b>Summe</b>	<b>106</b>	<b>45</b>	<b>104</b>
<b>Total</b>		<b>255</b>	

In der Gruppe B, welche die hochregulierten Gene zu den Zeitpunkten 0,5 h und 3 h umfasst, war eine Einteilung in funktionelle Gruppen nicht so deutlich. Herauszuheben sind wiederum die Kategorien „Metabolismus“ und „Energie“ (s.o.) aber auch die Kategorie „Protein Synthese“ (Tab. 3.3). Hier sind insbesondere die tRNA-Synthetasen codierenden Gene *CDC61*, *FRS1*, *GRS1* und *ILS1* zu nennen, da die starke Expression dieser Gene andeutete, dass die Proteinbiosynthese zu Beginn der Infektion aktiv war und neue Proteine synthetisiert wurden. Interessanterweise gingen aber die Expressionen der ribosomalen Gene im Laufe der Infektion zurück. Dies ist vergleichbar mit der Interaktion von *C. albicans* mit humanem Blut, wo bereits gezeigt werden konnte, dass die Proteinsynthese auch nur in den frühen Stadien stattfindet und zu den späteren Zeitpunkten reduziert wird (Fradin *et al.*, 2003).

Auch die Gene, die nur 5 h nach der Infektion stark exprimiert waren, ließen sich nicht so deutlich in funktionelle Kategorien einteilen (Tab. 3.3). Eine mögliche Ursache dafür wäre, dass zu diesem späten Infektionszeitpunkt eine heterogene Zellpopulation vorlag: einige Zellen waren bereits in die Leber eingedrungen während andere Zellen noch auf der Organoberfläche waren. Dennoch wurde erwartet, dass

genau zu diesem Zeitpunkt Gene verstärkt exprimiert werden, die für eine erfolgreiche Invasion benötigt werden.

Das Lebergewebe scheint eine eisenarme Umgebung für *C. albicans* darzustellen. Dies wurde daran deutlich, dass Gene wie *FET5*, *FTR1* und *ZRT1*, welche mit der Eisen- bzw. Zinkaufnahme assoziiert sind, nur zu diesem Zeitpunkt (5 h) eine verstärkte Expression zeigten. Weitere unter Eisenmangel hochregulierten Gene (Lan *et al.*, 2004), die zu den frühen Infektionszeitpunkten keine detektierbare Expression aufwiesen, waren auch zu diesem invasiven Zeitpunkt ebenfalls stark exprimiert. Dazu gehörten *CFL1*, *RBT5*, *FRE5* (alle Eisenaufnahme) und *CTR1* (Kupfer-Transporter). Eine mögliche Ursache für die erhöhte Expression dieser Gene könnte darin liegen, dass der pH-Wert des Lebergewebes bei 7,4 liegt und somit in diesem leicht alkalischen Milieu Eisen fast ausschließlich in der unlöslichen Form  $\text{Fe}^{3+}$  vorliegt. Interessanterweise scheinen die *C. albicans*-Zellen gegen den alkalischen pH zu arbeiten, da auch *PMA1*, ein Gen, welches für eine  $\text{H}^+$ -ATPase codiert, 5 h nach der Infektion eine erhöhte Expression zeigte. Dieses Hauptprotein der Plasmamembran ist für die intrazelluläre pH-Regulation und damit auch indirekt für den Nährstofftransport verantwortlich (Rao *et al.*, 1993).

Dass der pH-Wert der Bauchhöhle und der Leber tatsächlich leicht alkalisch ist, zeigte die starke Expression von *PHR1* (Abb. 3.22 B). Dieses pH-Markergen wird vorwiegend unter neutralen bis alkalischen Bedingungen exprimiert (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlschlegel und Fonzi, 1997) und zeigte auch in diesem Fall eine starke Expression erst nachdem die Pilzzellen aus der Vorkultur (pH ca. 5,5) in die Bauchhöhle gespritzt wurden (Abb. 3.22 B). Im Gegensatz dazu zeigte das Markergen für einen sauren pH-Wert, *PHR2* (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlschlegel und Fonzi, 1997), zunächst eine Verringerung in der Expressionstärke im Vergleich zur Vorkultur. Die Expression stieg dann aber zu den späteren Zeitpunkten (3 h und 5 h) wieder leicht an (Abb. 3.22 B). Weitere Gene, von denen gezeigt werden konnte, dass sie unter alkalischen Bedingungen hochreguliert werden (Bensen *et al.*, 2004), waren die Hyphen-assoziierten Gene *ECE1* und *HWP1* (Abb. 3.22 B) und Gene, die für einen Phosphat-Transporter (*PHO84*) bzw. einem  $\text{Na}^+$ -Transporter (*ENA22*) codieren. Die beiden letztgenannten Gene waren jedoch am stärksten zu den frühen Infektionszeitpunkten (0,5 h und 3 h) exprimiert.

Während die Verfügbarkeit von Eisen ein limitierender Faktor während der Invasion zu sein schien, waren andere Nährstoffe wie z.B. Stickstoff ausreichend vorhanden. Alle Gene, die unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen eine starke Expression zeigten (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003), waren während des gesamten Infektionsverlaufs unverändert. Insbesondere der zentrale Transkriptionsaktivator *GCN4* aber auch Gene, die mit der Methionin oder Arginin-Biosynthese assoziiert sind, zeigten keine erhöhte Expression.

Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Expression der für die Wirt-Pathogen-Interaktion bedeutenden sekretorischen Aspartatproteasen *SAP1-SAP10* (Naglik *et al.*, 2004) gestützt. So konnte eine erhöhte Expression von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* sofort nach Beginn der Infektion beobachtet werden, wobei die *SAP5*-Expression am stärksten war (Abb. 3.22 B). Diese drei Gene sind Hyphen-assoziiert und deuten neben den histologischen Befunden darauf hin, dass SC5314 während der Infektion Hyphen ausbildet. Im Gegensatz dazu stehen die drei Hefe-assoziierten Proteasen *SAP1*, *SAP2* und *SAP3*. Eine Expression konnte hier nur für *SAP2* 5 h nach der Infektion nachgewiesen werden. Die Expression von *SAP2* deutete allerdings darauf hin, dass SC5314 Proteine als Stickstoffquelle nutzt, da *SAP2* bevorzugt in Medien exprimiert wird, die Proteine als alleinige Stickstoffquelle enthalten.

Dass die meisten (wenn nicht sogar alle) Zellen, die in das Lebergewebe eingedrungen waren, Hyphen waren, ließ sich nicht nur an der Expression von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* ablesen. Auch Gene, die den Übergang von der Hefezelle zum Myzel steuern waren in den späten Infektionszeitpunkten stark exprimiert. Dazu gehörten die Gene, die für das 14-3-3 Protein *Bmh2*, den *Forkhead*-Transkriptionsfaktor *Fkh2* und den Transkriptionsregulator *Ssn6* codieren. Von all diesen Genen/Proteinen ist bereits gezeigt worden, dass sie den Hefe-Myzel-Übergang regulieren (Bensen *et al.*, 2002; Cognetti *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2003). Vergleichbar dazu wurden auch Hyphen-assoziierte Gene wie *DDR48*, *SOD5*, *PHR1*, *ECE1*, *ALS3*, *HWP1* und *RBT5* (Nantel *et al.*, 2002; Kadosh und Johnson, 2005) 5 h nach der Infektion hochreguliert. *ALS3* und *HWP1* wurden sogar zu allen drei Infektionszeitpunkten hochreguliert. Dies deutete darauf hin, dass diese beiden Adhäsionsgene schon zu Beginn der Infektion für die Adhäsion der *Candida*-Zellen an das Wirtsgewebe benötigt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Transkriptionsprofile war, dass während einer Organinvasion anscheinend andere Sauerstoffverhältnisse vorlagen als während der

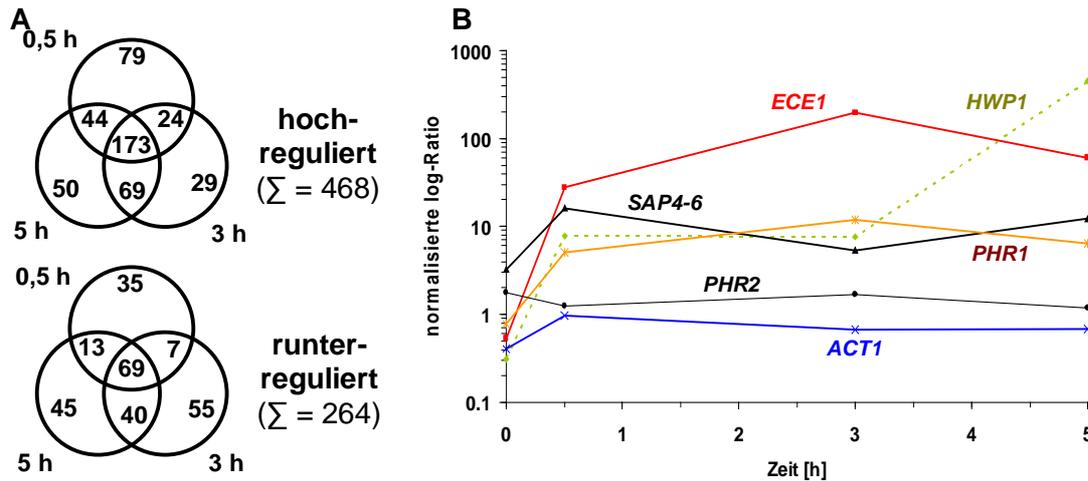
Adhäsion. So konnten die zu *S. cerevisiae* orthologen Gene *GAL10* und *AGP1* nach 5 h als hochreguliert identifiziert werden. Beide Gene wurden auch schon unter anaeroben Wachstumsbedingungen von *S. cerevisiae* hochreguliert (ter Linde *et al.*, 1999).

Neben all diesen bereits beschriebenen Genen gab es auch zu allen drei Infektionszeitpunkten eine größere Anzahl an Genen, deren Funktion bisher nicht bekannt ist. Hierbei ist es interessant, dass der prozentuale Anteil der Gene in den oben beschriebenen Gengruppen A, B und C (Tab. 3.3) von 13 % in A über 19 % in B bis hin zu 26 % in C ansteigt. Unter diesen Genen befinden sich auch solche, die keine Homologe in *S. cerevisiae* aufweisen (ca. 25 % der unbekannt Genen in Gruppe B und je ca. 50 % der unbekannt Genen in den Gruppen A und C). Da der größte Anteil an Genen mit unbekannter Funktion zu dem Zeitpunkt der Invasion in das Lebergewebe exprimiert wird, lässt sich spekulieren, dass diesen Genen eine besondere Bedeutung während des Invasionsprozesses zukommt.

### **3.5.1.2 Horizontale in vivo Analyse des Stamms ATCC10231**

Wie in der Histologie der *in vivo* Infektion (Abb. 3.16) und auch der *ex vivo* Infektion (Abb. 3.19) gezeigt werden konnte, ist ATCC10231 ein nicht-invasiver *C. albicans* Stamm (Kretschmar *et al.*, 1999a; Thewes *et al.*, 2007). Es wurde daher erwartet, dass sich dieser Unterschied zu SC5314 auch auf transkriptioneller Ebene widerspiegelt und es wurden deshalb Leberproben zu den benannten Zeitpunkten entnommen (vgl. Abb. 3.20) und Transkriptionsprofile erstellt.

In der horizontalen Analyse der *in vivo* Transkriptionsprofile von ATCC10231 konnten 1.195 Gene identifiziert werden, die in drei von vier Zeitpunkten ein detektierbares Signal aufwiesen. Von diesen Genen waren 468 in mindestens einem der drei Infektionszeitpunkte mindestens 2-fach stärker exprimiert als in der Vorkultur. 264 Gene waren in mindestens einem Zeitpunkt 2-fach schwächer exprimiert als in der Vorkultur. In einem Venn-Diagramm zeigten aber im Gegensatz zu SC5314 die hochregulierten Gene keine Aufteilung in nur drei Subgruppen (Abb. 3.23 A).



**Abb. 3.23:** *In vivo* exprimierte Gene des Stamms ATCC10231. **(A)** Venn-Diagramm der hoch- bzw. runterregulierten Gene zu den einzelnen Zeitpunkten der Infektion im Vergleich zur Vorkultur. **(B)** Expressionsprofil *in vivo* von ausgesuchten Genen.

Ein erster Vergleich der hochregulierten Gene aus ATCC10231 mit SC5314 zeigte, dass 92 Gene in beiden Stämmen stärker zu den Infektionszeitpunkten exprimiert sind als in der Vorkultur. Dazu gehörten u. a. *KGD1*, *KGD2* (beide Citratzyklus) und *PCK1* (Glukoneogenese), so dass davon auszugehen ist, dass auch Stamm ATCC10231 sowohl den Citratzyklus als auch die Glukoneogenese während einer Infektion benötigt. Interessanterweise wurden aber keine hochregulierten Gene der Glykolyse bei ATCC10231 entdeckt. Weitere Gemeinsamkeiten zu SC5314 bestanden in der starken Expression von *SAP4*, *SAP5*, *SAP6*, *HWP1* und *ECE1* (Abb. 3.22) aber auch *ALS3* und *SOD5*. Dies bestätigte das histologische Bild (Abb. 3.16), wonach Stamm ATCC10231 während der Infektion Hyphen bildet und somit auch die Hyphen-assoziierten Gene exprimiert. Weitere überlappende Genexpressionen zwischen den beiden Stämmen gab es z.B. auch bei den Zuckertransporter codierenden Genen *HGT11* und *HXT5*. Alles in allem lässt sich daher sagen, dass die Expression der genannten Gene alleine keine Invasion in Wirtsgewebe vermittelt.

Neben diesen Gemeinsamkeiten gab es aber auch eine Reihe von Genen, die spezifisch zu einem der drei Infektionszeitpunkte in ATCC10231 hochreguliert wurden. Tabelle 3.4 gibt die funktionellen Kategorien der hochregulierten Gene zu den einzelnen Infektionszeitpunkten wieder. Unterschiede zu SC5314 ergaben sich besonders in den Kategorien „Zellzyklus und DNA-Prozessierung“ und „Unbekannte Funktion“. So wurden mehr Zellzyklus-assoziierte Gene zu allen drei Zeitpunkten in

ATCC10231 als in SC5314 hochreguliert (20 von 173 bei ATCC10231 im Vergleich zu 8 von 106 bei SC5314). Bei den Genen mit unbekannter Funktion konnte beobachtet werden, dass zu allen Zeitpunkten der prozentuale Anteil bei ATCC10231 immer höher lag als bei SC5314 (vgl. Tab. 3.3 und 3.4). Auch hier könnten dies wie bei Stamm SC5314 Gene sein, die spezifisch für einen infektiösen Lebensstil von *C. albicans* benötigt werden.

**Tabelle 3.4:** Einteilung der 468 *in vivo* hochregulierten Gene aus ATCC10231 in funktionelle Kategorien (vgl. auch Abb. 3.23 A).

Kategorie	ATCC10231						
	Zeitpunkt						
	0,5 h	0,5 h und 3 h	nur 3 h	3 h und 5 h	nur 5 h	5 h und 0,5 h	alle Zeitpunkte
Metabolismus	20	5	7	18	13	11	47
Energie	2	-	-	3	2	-	8
Zellzyklus und DNA-Prozessierung	7	-	2	9	4	4	20
Transkription	6	3	1	8	7	7	15
Protein Synthese	5	-	3	2	2	1	7
Protein-Katabolismus und -Sortierung	8	4	1	2	2	2	17
zellulärer Transport	4	2	-	4	2	3	9
zelluläre Kommunikation	-	-	1	1	-	-	3
Zell-Rettung, Abwehr und Virulenz	4	-	-	2	-	1	6
Interaktion mit der Umwelt	1	1	-	-	1	3	1
Biogenese zellulärer Bestandteile	-	-	-	-	-	-	1
Zelldifferenzierung	-	-	-	-	-	-	2
Unbekannte Funktion (%)	22(28)	9(38)	14(48)	20(29)	17(34)	12(27)	37(21)
<b>Summe</b>	<b>79</b>	<b>24</b>	<b>29</b>	<b>69</b>	<b>50</b>	<b>44</b>	<b>173</b>
<b>Total</b>	<b>468</b>						

Betrachtet man jetzt noch weitere Gene im Vergleich zu SC5314 so konnte beobachtet werden, dass u. a. Gene, die mit dem Eisen- oder Kupfer-transport wie *FTR1* und *CTR1* in ATCC10231 während der Infektion nicht hochreguliert werden. Dies könnte auf einen Defekt in der Außenwahrnehmung von ATCC10231 hindeuten oder darauf, dass die starke Expression dieser Gene mit der Invasion assoziiert ist bzw. dass Eisen-limitierende Bedingungen nur im Lebergewebe auftreten. Weiterhin wurde beobachtet, dass zwar *PHR1*, das Markergen für einen alkalischen pH-Wert, hochreguliert wird, *PHR2* jedoch, welches das Markergen für einen sauren pH-Wert ist, nicht wie bei SC5314 nach 30 min runterreguliert wurde (Abb. 3.23). Auch hier lässt sich vermuten, dass ATCC10231 den alkalischen pH-Wert nicht richtig

wahrnehmen konnte oder dass in der Bauchhöhle die Pilzzellen sowohl einem alkalischen pH-Wert und gleichzeitig auch eine Population einem sauren pH-Wert ausgesetzt war.

### 3.5.1.3 Vertikale Analyse der Transkriptionsprofile von SC5314 und ATCC10231 *in vivo*

Die horizontale Analyse der *in vivo* Transkriptionsprofile zeigte die Expression der Gene im zeitlichen Verlauf für jeden Stamm separat. Es konnte aber nur indirekt eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein spezielles Gen in einem Stamm stärker exprimiert wird als in dem anderen. Deshalb wurden nach Murillo *et al.* (Murillo *et al.*, 2005) die Transkriptionsprofile vertikal analysiert. Dazu wurden die einzelnen Zeitpunkte direkt unter den beiden Stämmen verglichen (z.B. 3 h SC5314 mit 3 h ATCC10231). Die einzelnen Transkriptionsprofile wurden dazu kombiniert normalisiert, so dass direkte Aussagen über die Expressionstärke eines Gens in einem Stamm im Vergleich zum anderen Stamm möglich waren.

Mit Hilfe dieses Analyseansatzes konnten 248 Gene identifiziert werden, die mindestens 2-fach stärker in SC5314 in mindestens einem der vier Zeitpunkte exprimiert waren. Gleichzeitig wurden auch 302 Gene in ATCC10231 identifiziert, für die diese Kriterien zutrafen.

**Tabelle 3.5:** Funktionelle Kategorien der stärker exprimierten Gene *in vivo* in SC5314 bzw. ATCC10231 nach vertikaler Analyse.

Kategorie	SC5314	ATCC10231
Metabolismus	48	81
Energie	1	8
Zellzyklus und DNA-Prozessierung	17	25
Transkription	25	24
Protein Synthese	16	10
Protein-Katabolismus und -Sortierung	25	9
zellulärer Transport	16	12
zelluläre Kommunikation	7	8
Zell-Rettung, Abwehr und Virulenz	1	6
Interaktion mit der Umwelt	2	-
Transposable Elemente, virale und Plasmid- Proteine	-	1
Biogenese zellulärer Bestandteile	4	2
Zelldifferenzierung	-	-
Unbekannte Funktion (%)	86 (35)	116 (38)
<b>Summe</b>	<b>248</b>	<b>302</b>
<b>Stamm-spezifisch</b>	<b>215</b>	<b>269</b>

Wie die Tabelle 3.5 zeigt, sind von den 248 stärker exprimierten Genen von SC5314 215 Stamm-spezifisch. Das heißt, dass diese Gene nur eine stärkere Expression in mindestens einem Zeitpunkt im Vergleich zu ATCC10231 aufweisen und die Gene auch zu keinem anderen Zeitpunkt in ATCC10231 stärker exprimiert wurden. So konnten auch 269 Stamm-spezifische Gene in ATCC10231 identifiziert werden.

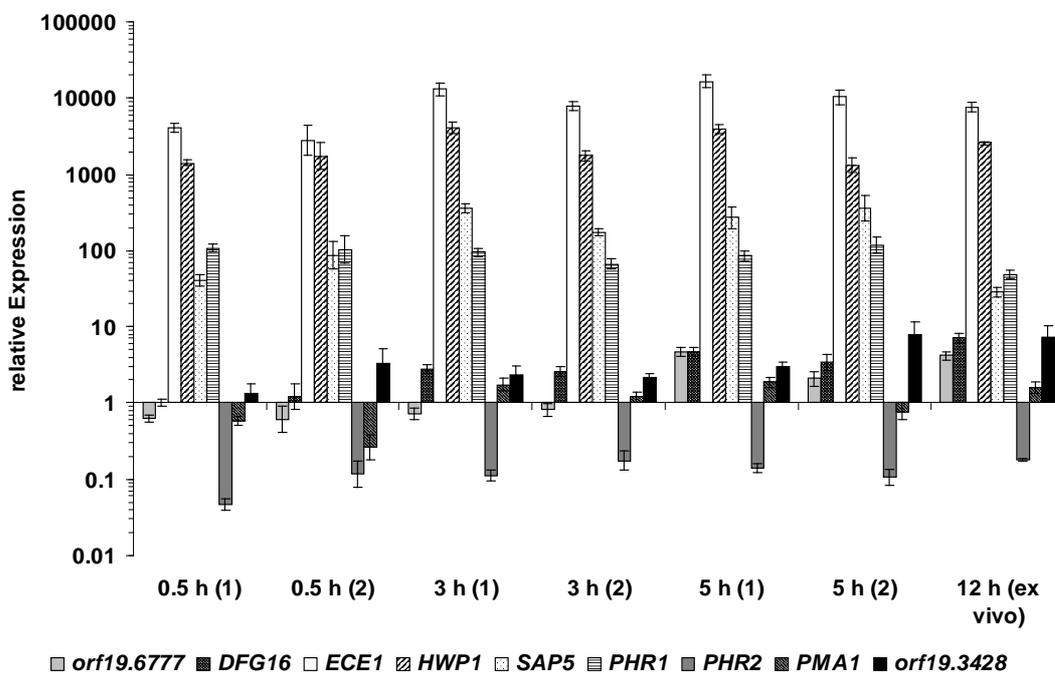
Eine Einteilung der Gene in funktionelle Kategorien zeigte, dass die Hauptunterschiede in den beiden funktionellen Kategorien „Metabolismus“ und „Protein-Katabolismus und –Sortierung“ lagen. So waren in ATCC10231 81 von den 302 Genen (26,8 %) assoziiert mit dem Metabolismus. Bei SC5314 waren dies nur 48 von 248 Genen (19,4 %). Ein gegensätzliches Bild ergab sich bei den Genen, die mit dem Protein-Katabolismus assoziiert waren. Hier zeigte SC5314 mit 10,1 % (25 von 248) einen deutlich höheren Anteil als ATCC10231 mit 3 % (9 von 302).

Auf der Ebene der einzelnen Gene zeigte sich, dass bei Stamm ATCC10231 vor allem Gene, die mit dem Ergosterol-Metabolismus assoziiert sind, stärker exprimiert waren als in SC5314. Dazu gehörten *ERG2*, *ERG7*, *ERG11*, *ERG26*, *ERG27* und *ERG251*. Weitere Gene aus dem Bereich Metabolismus deuteten eine Aktivierung des Glyoxylatzyklus bei Stamm ATCC10231 an. So waren das Isocitrat-Synthase Gen *ICL1*, das Citrat-Synthase Gen *CIT1*, das Malat-Dehydrogenase Gen *MDH11* und das Acetyl-CoA-Synthetase Gen *ACS1* in ATCC10231 stärker exprimiert als in SC5314. Besonders *ICL1* zeigte bei allen drei Infektionszeitpunkten (0,5 h, 3 h und 5 h) eine deutlich stärkere Expression in ATCC10231 im Vergleich zu SC5314. Unter den Genen, die in SC5314 stärker exprimiert waren als in ATCC10231 befanden sich sieben Gene, die in Ubiquitinierung oder Proteasom-Zusammenbau involviert sind. Dies könnte bedeuten, dass SC5314 einen höheren Proteinumsatz aufwies als ATCC10231. Weitere Gene, die in SC5314 stärker exprimiert waren und die auch schon bei der horizontalen Analyse beschrieben wurden, waren *FKH2*, *FTR1* und *PMA1*. Alle drei Gene waren zu den beiden späteren Infektionszeitpunkten 3 h und 5 h stark exprimiert, so dass dies auch die Hypothese stützt, dass diese Gene mit der Invasion assoziiert sein könnten.

#### **3.5.1.4 Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR**

Die Ergebnisse der *in vivo* Analyse von Stamm SC5314 wurden mittels quantitativer RT-PCR bestätigt. Dazu wurde die RNA von jedem der drei Infektionszeitpunkte

(30 min, 3 h und 5 h) von je zwei unterschiedlichen Organproben in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe einer TaqMan-PCR wurde die relative Expressionsstärke der entsprechenden Gene im Vergleich zur Referenz ermittelt. Als endogene Kontrolle diente die Transkriptmenge von *ACT1*, da sich bereits in den Transkriptionsprofilen zeigte, dass die Expression von *ACT1* innerhalb der verschiedenen Infektionszeitpunkte nahezu unverändert war (vgl. Abb. 3.22). Mit Hilfe der endogenen Kontrolle und der *Common Reference* als Kalibrator konnte so über die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001) die relative Expression ausgewählter Gene ermittelt werden.



**Abb. 3.24:** Relative Expression ausgewählter Gene von Stamm SC5314 im Vergleich zur Referenz.

Wie in Abb. 3.24 zu erkennen ist, zeigten die Gene *ECE1*, *HWP1*, *SAP5* und *PHR1* in der quantitativen RT-PCR der *in vivo* Zeitpunkte eine vergleichbar starke Expression wie in den Transkriptionsprofilen (vgl. Abb. 3.22). *PHR2* und *PMA1* zeigten bei dieser Methode einen nicht ganz so starken Anstieg der Expressionsstärke im Vergleich zu den Transkriptionsprofilen. Insbesondere für *PMA1* ist aber anzumerken, dass bei der quantitativen RT-PCR einzelne Organe betrachtet wurden wo hingegen die Ergebnisse der Transkriptionsprofile als Mittelwert aus zwei Organproben errechnet wurden.

Weiterhin wurden drei Gene analysiert, die bei den Transkriptionsprofilen sowohl in den beiden *in vivo* Zeitpunkten 3 h und 5 h als auch in dem *ex vivo* Zeitpunkt 12 h eine stärkere Expression als in der Referenz zeigten (siehe auch 3.5.3). Die relative Expression von *orf19.6777*, *orf19.3428* und *DFG16* zu den einzelnen Zeitpunkten der Transkriptionsprofile konnte mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden.

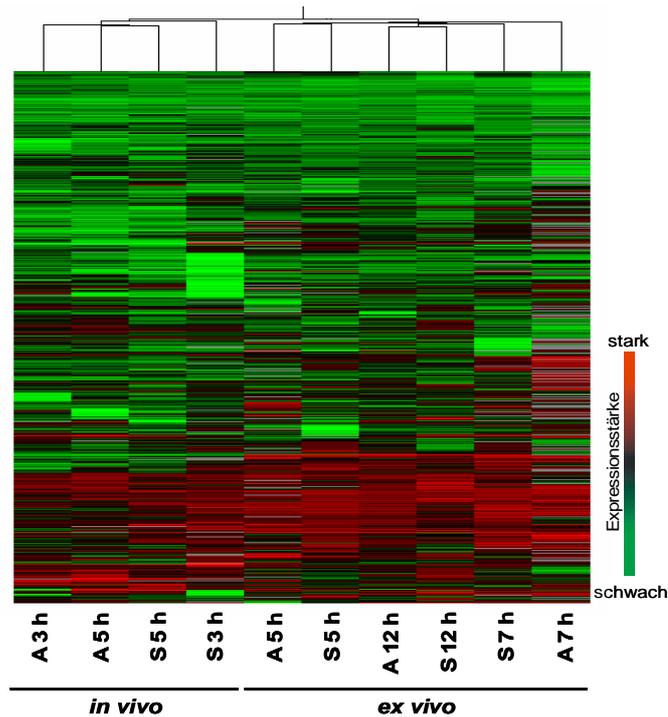
### 3.5.2 *Ex vivo* Transkriptionsprofile

Um die grundlegenden Mechanismen der Invasion von *C. albicans* in parenchymale Organe zu verstehen, wurde neben den Transkriptionsprofilen der *in vivo* Infektion auch Transkriptionsprofile der *ex vivo* Infektion der Schweineleber analysiert. Es wurde dabei die Hypothese verfolgt, dass in unterschiedlichen Invasionsmodellen der Leber die grundlegenden Mechanismen identisch sein müssten. Da die Invasion in die Schweineleber im Vergleich zur Mäuseleber zeitverzögert ablief, wurden für die *ex vivo* Transkriptionsprofile die Zeitpunkte 5 h (Adhäsion), 7 h (oberflächliche Invasion) und 12 h (tiefe Invasion) ausgewählt (vgl. Abb. 3.19 und 3.20).

#### 3.5.2.1 Vergleich der Transkriptionsprofile *in vivo* und *ex vivo* durch hierarchisches Clustern

Um zu untersuchen, wie ähnlich sich die Transkriptionsprofile der beiden unterschiedlichen Infektionsmodelle sind, wurden die Profile nach Eisen *et al.* hierarchisch geclustert (Eisen *et al.*, 1998). Dazu wurden zunächst die Gesamtprofile der *in vivo* Zeitpunkte 3 h und 5 h von SC5314 und ATCC10231 mit den *ex vivo* Zeitpunkten 5 h, 7 h und 12 h von beiden Stämmen verglichen.

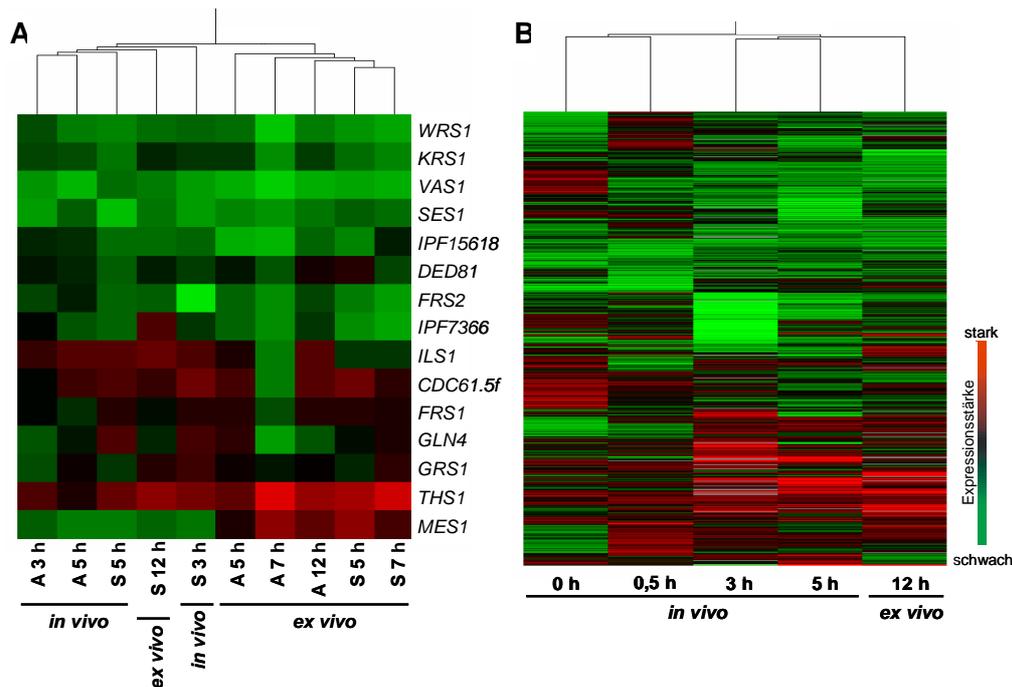
Abbildung 3.25 gibt die Clusteranalyse der unterschiedlichen *in vivo* und *ex vivo* Zeitpunkte wieder. Dabei zeigte sich, dass sich die *in vivo* und *ex vivo* Transkriptionsprofile von beiden Stämmen deutlich voneinander abgrenzen. Dies bestätigte gleichzeitig die histologischen Befunde, wonach die Invasion in die Schweineleber im zeitlichen Verlauf unterschiedlich zur Invasion in die Mäuseleber war.



**Abb. 3.25:** Kombinierte Clusteranalyse der *in vivo* Infektionszeitpunkte 3 h und 5 h und der *ex vivo* Zeitpunkte 5 h, 7 h und 12 h von SC5314 (S) und ATCC10231 (A).

Wenn man sich allerdings einzelne Gengruppen betrachtet, so konnte beobachtet werden, dass in SC5314 z.B. Gene, die für tRNA-Synthetasen codieren, eine ähnliche Expression 12 h *ex vivo* wie 3 h und 5 h *in vivo* aufwiesen (Abb. 3.26 A). Da die anderen Expressionsprofile – insbesondere von ATCC10231 – ansonsten kaum Ähnlichkeiten zwischen *in vivo* und *ex vivo* zeigten, wurden im Folgenden nur die *ex vivo* Transkriptionsprofile von SC5314 und hier speziell der 12 h Zeitpunkt analysiert. In der Abbildung 3.26 B ist daher nur der 12 h *ex vivo* Zeitpunkt im Vergleich zu den *in vivo* Zeitpunkten und der Vorkultur, die für beide Infektionsmodelle gleich war (SDA-Medium), hierarchisch geclustert worden.

Wie die Abbildung zeigt, liegen die Profile der drei invasiven Zeitpunkte 3 h, 5 h und 12 h deutlich getrennt von der Vorkultur (0 h) und dem sehr frühen Infektionszeitpunkt 0,5 h. Dies unterstreicht die Annahme, dass während der Invasion in die Leber ein spezifisches Transkriptionsprogramm in *C. albicans* gestartet wird.

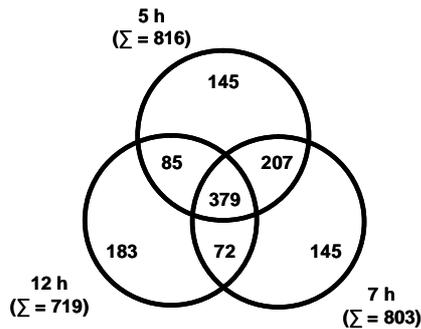


**Abb. 3.26:** (A) Clusteranalyse der tRNA-Genexpressionen *in vivo* und *ex vivo* von SC5314 (S) und ATCC10231 (A). (B) Clusteranalyse der *in vivo* Transkriptionsprofile zusammen mit dem 12 h *ex vivo* Profil und der Vorkultur von SC5314.

### 3.5.2.2 Horizontale Analyse der *ex vivo* Transkriptionsprofile von SC5314

Da durch die Clusteranalyse bereits angedeutet wurde, dass die *ex vivo* Transkriptionsprofile von ATCC10231 kaum Ähnlichkeit mit den *in vivo* Profilen aufwiesen, wurden nur die *ex vivo* Profile von SC5314 einer horizontalen Analyse unterzogen.

Nach dem Filtern der Daten entsprechend der *in vivo* Analyse konnten in den *ex vivo* Transkriptionsprofilen von SC5314 1.216 Gene identifiziert werden, die in mindestens einem Infektionszeitpunkt (5 h, 7 h oder 12 h) mindestens zweimal stärker exprimiert waren als in der Vorkultur. Es zeigte sich dabei, dass die meisten Gene entweder zu allen Zeitpunkten (379 Gene), zu den beiden frühen Zeitpunkten 5 h und 7 h (207 Gene) oder ausschließlich zum Zeitpunkt 12 h (183 Gene) hochreguliert werden (Abb. 3.27). Es gab weiterhin nur eine geringe Überschneidung der Zeitpunkte 5 h und 12 h (85 Gene) bzw. 7 h und 12 h (72 Gene). Es lässt sich somit sagen, dass sich die hochregulierten Gene *ex vivo* mehrheitlich in die drei gleichen Hauptgruppen einteilen lassen wie *in vivo* (vgl. Tab. 3.3): (A) hochreguliert zu allen Zeitpunkten, (B) hochreguliert nur zu den beiden frühen Zeitpunkten 5 h und 7 h und (C) nur hochreguliert bei der tiefen Invasion nach 12 h.



**Abb. 3.27:** Venn-Diagramm der *ex vivo* hochregulierten Gene von SC5314.

Teilt man die Gene dieser drei Gengruppen in funktionelle Kategorien ein, so ergeben sich sowohl weitere Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zu den *in vivo* Ergebnissen (Tab. 3.6).

**Tabelle 3.6:** Einteilung von 769 *ex vivo* hochregulierten Gene des Stamms SC5314 in funktionelle Kategorien. Die Einteilung der Gene entsprach der gleichen Einteilung in drei Subgruppen wie in Tab. 3.3 (vgl. auch Abb. 3.27).

SC5314 ( <i>ex vivo</i> )			
Kategorie	Zeitpunkt		
	alle Zeitpunkte (A)	5 h und 7 h (B)	nur 12 h (C)
Metabolismus	102	56	47
Energie	9	6	2
Zellzyklus und DNA-Prozessierung	37	22	23
Transkription	24	23	8
Protein Synthese	11	8	2
Protein-Katabolismus und -Sortierung	31	17	15
zellulärer Transport	18	8	9
zelluläre Kommunikation	4	3	2
Zell-Rettung, Abwehr und Virulenz	13	4	4
Interaktion mit der Umwelt	5	2	1
Biogenese zellulärer Bestandteile	5	2	1
Zelldifferenzierung	0	-	1
Unbekannte Funktion (%)	120 (32)	56 (27)	68 (37)
<b>Summe</b>	<b>379</b>	<b>207</b>	<b>183</b>
<b>Total</b>		<b>769</b>	

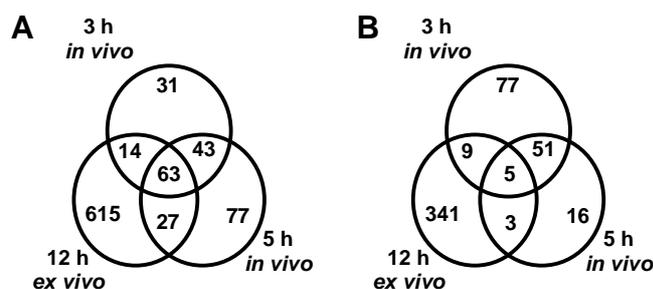
So konnte auch hier in allen drei Subgruppen ein hoher Anteil an Genen identifiziert werden, der den eng verflochtenen funktionellen Kategorien „Metabolismus“ und „Energie“ zuzuordnen ist. Insbesondere die starke Expression von *PFK1* und *PFK2* in allen Zeitpunkten und *KGD1* und *KGD2* bei den beiden frühen Infektionszeitpunkten zeigen die Parallelen zwischen dem *in vivo* und *ex vivo* Infektionsmodell in Bezug auf den Metabolismus (vgl. 3.5.1.1). In Bezug auf Stressantwort konnte beobachtet werden, dass Hitzeschockgene wie *HSP78*,

*HSP60*, *HSP12*, *HSP90* und *DDR48* zu allen Zeitpunkten hochreguliert waren. Im Gegensatz zu der *in vivo* Situation gab es *ex vivo* eine temporär starke Expression vom Katalase-codierenden Gen *CAT1*, so dass davon auszugehen ist, dass Zellen von Stamm SC5314 im *ex vivo* Modell zumindest temporär oxidativem Stress ausgesetzt waren. Weiterhin gab es Parallelen in Bezug auf die Nährstoffsituation in den beiden Infektionsmodellen. So waren *RBT5* und *PHO84* auch im *ex vivo* Modell hochreguliert. Dies deutete einen Mangel an Eisen und Phosphat während der Infektion an. Schließlich wurden auch Gene als hochreguliert identifiziert, die den Hefe-Myzel-Übergang regulieren oder Hyphen-assoziiert sind. Zu den Regulatorgenen gehörten *BMH2*, welches zu allen Zeitpunkten stark exprimiert war, und *FKH1*, welches nur in den beiden frühen Zeitpunkten 5 h und 7 h hochreguliert war. Als Hyphen-assoziiertes Gen konnte in dem 12 h Zeitpunkt *HYR1* (Bailey *et al.*, 1996) ausgemacht werden. Auch hier bestätigte das Transkriptionsprofil die Histologie, wonach bei der Invasion Hyphen involviert sind.

Als letzter Punkt sei noch zu erwähnen, dass der Anteil der Gene, denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, auch *ex vivo* während der Invasion (12 h) am höchsten ist. Auch hier ist zu vermuten, dass die Expression dieser Gene spezifisch für die Invasion benötigt wird.

### 3.5.3 Vergleich der invasiven Zeitpunkte *in vivo* und *ex vivo*

Da der 12 h Zeitpunkt des *ex vivo* Infektionsmodells am meisten Ähnlichkeit zu den *in vivo* Zeitpunkten zeigte (vgl. 3.5.2.1) wurden abschließend die drei Zeitpunkte 3 h und 5 h *in vivo* und 12 h *ex vivo* miteinander verglichen. Dafür wurden die drei Zeitpunkte zusammen normalisiert, so dass sich eine andere Genkonstellation ergab als in den horizontalen Analysen.



**Abb. 3.28:** (A) Venn-Diagramm der *in vivo* und *ex vivo* hochregulierten Gene nach horizontaler Analyse. (B) Venn-Diagramm der *in vivo* und *ex vivo* hochregulierten Gene nach Abzug von ATCC10231.

Es konnten so 870 Gene identifiziert werden, die zu mindestens einem der drei Zeitpunkte mindestens zweimal stärker exprimiert waren als in der Vorkultur. Bei der Analyse waren jetzt allerdings die Gene interessant, die in allen drei Zeitpunkten hochreguliert waren. Unter diesen 63 Genen (Abb. 3.28 A) befanden sich Hitzeschockgene wie *HSP90*, *HSP78* und *DDR48*, das glykolytische Markergen *PFK2* und die anaeroben Markergene *AGP1* und *GAL10*. Weiterhin wurden darunter auch *ALS3* und *PHR1* identifiziert. Diese Daten unterstrichen somit noch einmal die Daten der horizontalen Analysen *in vivo* und *ex vivo* in Bezug auf Metabolismus, Stressantwort, anaerobes Wachstum, Hyphen und pH-Wert.

In einem zweiten Analyseansatz wurden bei den drei invasiven Zeitpunkten die Gene abgezogen, die auch in ATCC10231 hochreguliert waren, da diese Gene vermutlich nichts mit der Invasion zu tun haben. Dabei wurde die Expression nicht im Vergleich zur Vorkultur sondern über die Referenz verglichen. Auf diese Weise konnten 502 Gene identifiziert werden, die in mindestens einem invasiven Zeitpunkt von SC5314 eine signifikant stärkere Expression im Vergleich zur Referenz und stärker exprimiert im Vergleich zu ATCC10231 waren. Das Venn-Diagramm zeigt, dass diese Gene überwiegend Modell-spezifisch exprimiert wurden. So waren 341 von 358 Genen spezifisch für den *ex vivo* Zeitpunkt 12 h und 77 von 142 bzw. 16 von 75 Genen spezifisch für die *in vivo* Zeitpunkte 3 h und 5 h (+ 51 Genen in der Schnittmenge von 3 h und 5 h; Abb. 3.28 B). Dennoch konnten fünf Gene identifiziert werden, die in allen drei Zeitpunkten in SC5314 stark exprimiert waren, in ATCC10231 hingegen nicht. Bei diesen Genen handelte es sich um *orf19.6777* (unbekannte Funktion), *orf19.5446*, einem Gen welches für ein putatives Membranprotein mit einer Membrandomäne codiert und von dem Hyphenregulator Ssn6 reguliert wird (Garcia-Sanchez *et al.*, 2005), *FUM12*, einem putativen Fumarat-Hydratase-Gen, *orf19.3428*, einem Gen welches für ein Protein mit einer PWWP-Domäne für Protein-Protein-Interaktionen codiert und *DFG16*, einem Gen welches für einen putativen Membranrezeptor mit sieben Transmembrandomänen codiert.

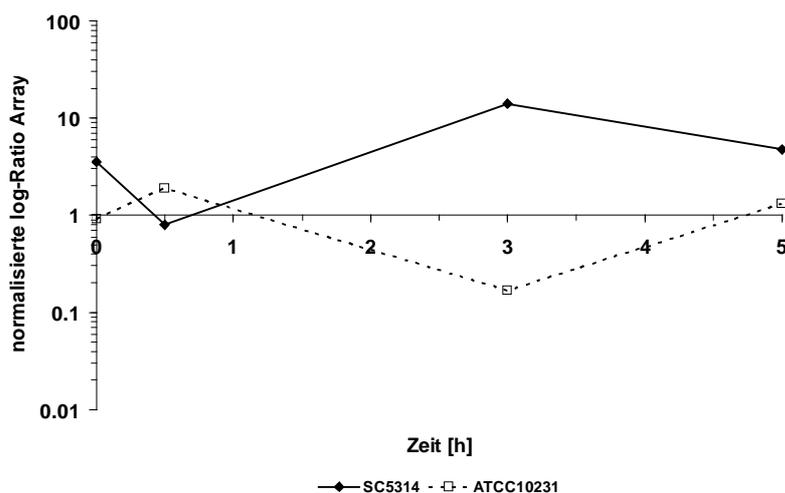
Es wurde vermutet, dass diese fünf Gene eine wichtige Rolle während der Invasion in die Leber spielen und es wurde deshalb eines von diesen Genen, *DFG16*, näher charakterisiert.

### 3.6 Charakterisierung der Invasions-assoziierten Gene *AXL1* und *DFG16*

Aus den Ergebnissen der Analyse der *in vivo* und *ex vivo* Transkriptionsprofile wurden zwei Gene ausgewählt, die näher charakterisiert wurden. Bei den beiden Genen handelte es sich um *AXL1* und *DFG16*. *AXL1* ist ein Gen, welches für eine putative Metalloproteinase codiert. Die genaue Funktion in *C. albicans* wurde allerdings noch nicht beschrieben. *DFG16* war zum Zeitpunkt der Transkriptionsprofilanalyse ein Gen, welches für ein putatives Transmembranprotein mit unbekannter Funktion codiert. Während der experimentellen Charakterisierung wurde allerdings von Barwell *et al.* herausgefunden, dass dieses Gen in die pH-induzierte Myzelbildung bei *C. albicans* involviert ist (Barwell *et al.*, 2005).

#### 3.6.1 Charakterisierung von *AXL1*

*C. albicans AXL1* wurde für eine nähere Charakterisierung ausgewählt, weil das Gen bei der vertikalen Analyse der *in vivo* Transkriptionsprofile von SC5314 und ATCC10231 neben der Vorkultur vor allem eine stärkere Expression in den beiden invasiven Zeitpunkten 3 h und 5 h aufwies (Abb. 3.29).



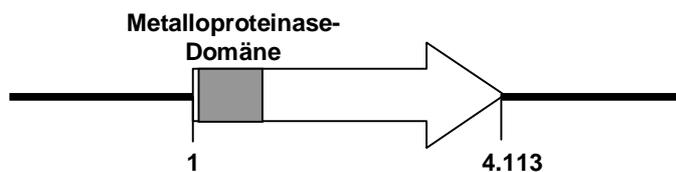
**Abb. 3.29:** *In vivo* Expression von *AXL1* in SC5314 und ATCC10231. Neben der Vorkultur war das Gen in den beiden invasiven Zeitpunkten 3 h und 5 h deutlich stärker in SC5314 als in ATCC10231 exprimiert.

Die Funktion des codierten Proteins ist in *C. albicans* noch nicht bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass *AXL1* unter Pheromon-Gabe ausschließlich in **a**-Stämmen induziert wird (Tsong *et al.*, 2006). Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass

Axl1 bei haploiden Zellen einen Einfluss auf das axiale Wachstum hat (Fujita *et al.*, 1994) und dass Axl1 in die Prozessierung vom **a**-Faktor involviert ist (Adames *et al.*, 1995). Weiterhin konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Axl1 in der Membran des Sprossungshalses lokalisiert ist (Lord *et al.*, 2002) und dass eine Mutation in diesem Gen unter anderem zu einem hyperinvasiven Phänotyp führt (Cullen und Sprague, 2002).

All diese Punkte ließen die Vermutung zu, dass Axl1 in *C. albicans* auch einen Einfluss auf die Invasivität haben könnte. Deshalb wurde das Gen disruptiert und die Mutante phänotypisch charakterisiert.

*AXL1* ist ein Gen mit 4.113 Basenpaaren, welche für ein putatives Protein mit 1.371 Aminosäuren codieren. Das theoretische Molekulargewicht von Axl1 beträgt ca. 158 kDa. Im *C. albicans* Genom liegt *AXL1* auf Chromosom R zwischen *tRNA-Asp* (tRNA Aspartat Anticodon GTC) und *PRP4* (Komponente des U4/U6 snRNP-Komplexes). Das putative Protein Axl1 besitzt eine für Metalloproteinasen konservierte Region (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30:** Genomische Struktur von *AXL1*. Bei der Transformation wurde die gesamte Metalloproteinas-Domäne deletiert. Größenangaben in bp.

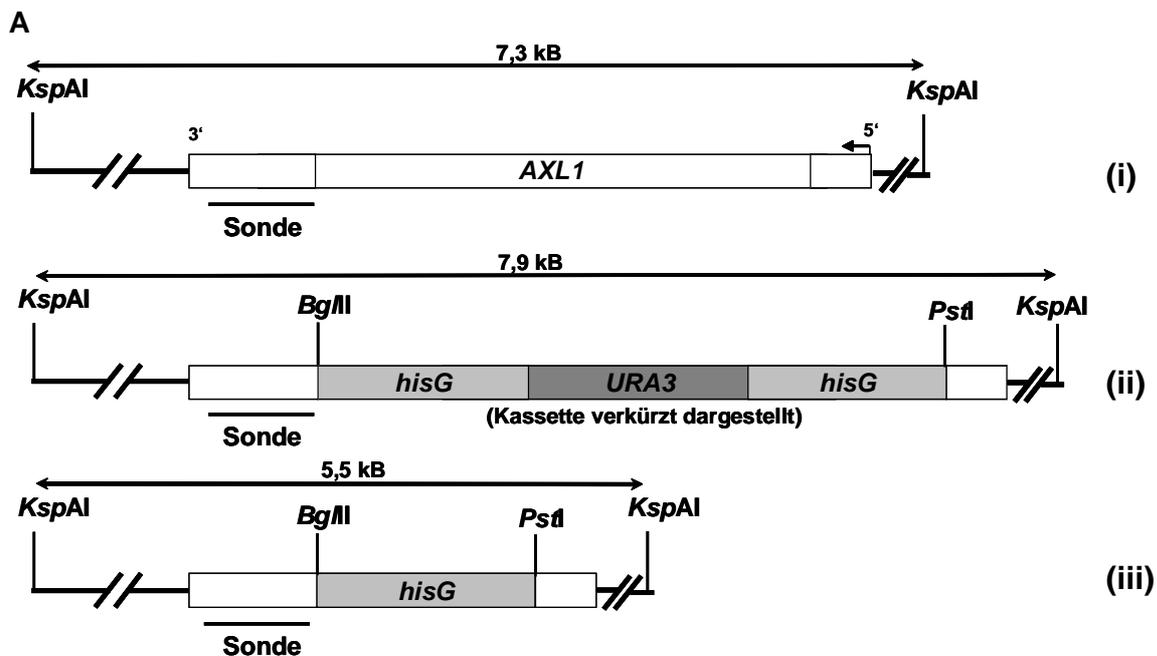
### 3.6.1.1 Herstellung einer Disruptionskassette und Deletion von *AXL1*

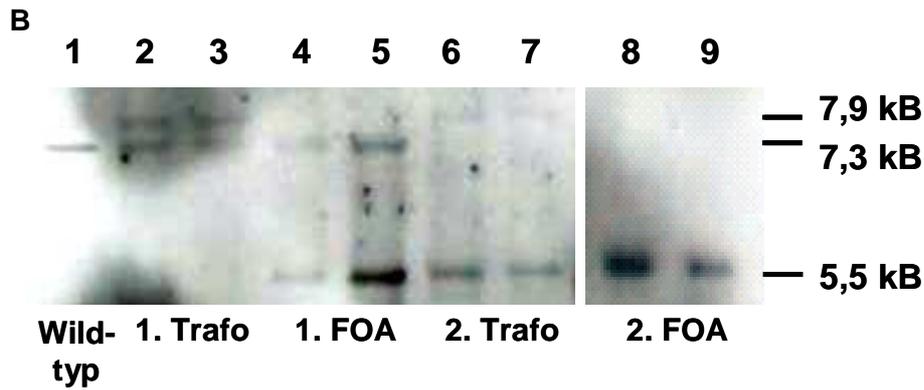
Die Herstellung der Mutante erfolgte nach dem Ura-Blaster-Protokoll (Fonzi und Irwin, 1993). Durch diese Methode lassen sich beide Allele eines Gens in einem Uridin-auxotrophen *C. albicans* Stamm deletieren. Nach der Transformation des *URA3*-Gens kann die Disruption des ersten Alleles durch Medien, die kein Uridin enthalten, selektiert werden. Da *URA3* von zwei identischen *hisG*-Sequenzen flankiert wird, kann der Selektionsmarker wiederverwendet werden. Man streicht dazu positive Transformanten auf Medien aus, die 5-Fuoroorotsäure (5-FOA) enthalten. Da diese Substanz für alle Zellen toxisch ist, die ein funktionelles *URA3*-Gen enthalten, kann durch homologe Rekombination der *hisG*-Sequenzen *URA3* deletiert werden und somit werden Uridin-auxotrophe Zellen selektiert. Es bleibt

dabei eine Kopie von *hisG* in dem zu deletierenden Gen erhalten. Der *URA3*-Marker kann anschließend zur Deletion des zweiten Allels wiederverwendet werden.

Für die Deletion von *AXL1* wurde eine Kasette konstruiert, die neben dem *hisG-URA3-hisG* zwei flankierende Bereiche von *AXL1* aufwies. Dazu wurde zunächst der 5'-Bereich (vordere Flanke) von *AXL1* von -463 bis 5 mittels PCR mit den Primern 19813-fwd-SacI und 19813-KO-1 amplifiziert, mit SacI und *Bgl*II geschnitten und in den entsprechend verdauten Vektor pMB-7 kloniert. Dadurch entstand pKO-AXL1-v. Für die hintere Flanke (3'-Bereich) wurde der Bereich von 2.911 bis 3.571 mit den Primern 19813-rev-HindIII und 19813-KO-2 amplifiziert, mit *Hind*III und *Pst*I geschnitten und in den entsprechend verdauten Vektor pKO-AXL1-v kloniert. Der so konstruierte Deletionsvektor erhielt die Bezeichnung pKO-AXL1. Mit diesem Vektor wurde der gesamte mittlere Teil von *AXL1* inklusive der Metalloproteinase-Domäne deletiert.

Die Deletion der beiden Allele von *AXL1* erfolgte in CAI-4 nach einem modifizierten Protokoll von Walther und Wendland (Walther und Wendland, 2003). Eine korrekte Integration der Deletionskasette wurde mittels Southern-Blot überprüft. Abbildung 3.31 gibt eine schematische Übersicht und die Southern-Blot-Ergebnisse der verschiedenen Transformationsrunden anhand von zwei isogenen Mutanten wieder (Abb. 3.31 B).



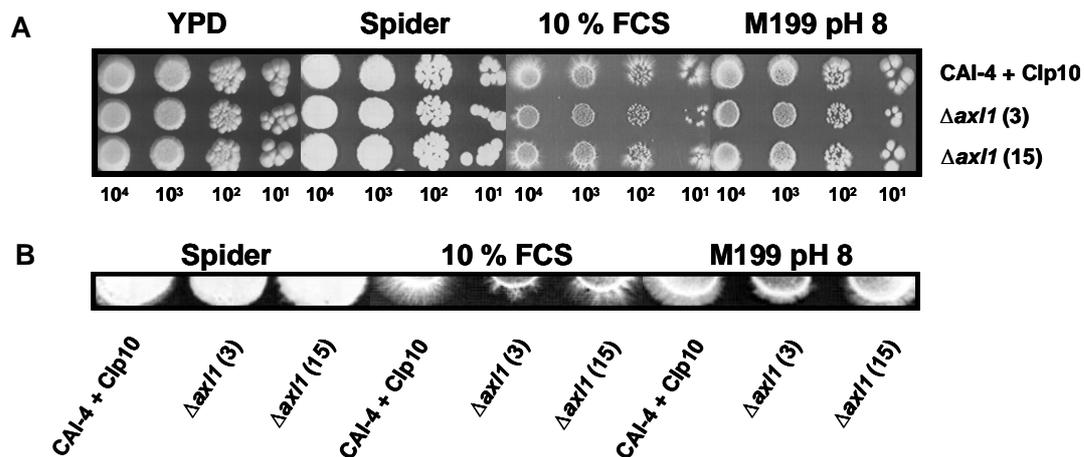


**Abb. 3.31:** Southern-Blot Analyse der Deletion von *AXL1*. **(A)** Schematische Darstellung der zu erwartenden Bandengrößen. Die verwendete Sonde für den Southern-Blot war identisch mit der hinteren Flanke der Deletionskassette. (i) Bandengröße im Wildtyp-Allel. (ii) Größe der Bande nach Transformation. (iii) Bandengröße nach 5-FOA Behandlung. Die Größenrelationen stimmen nicht überein. **(B)** Southern-Blot (*Ksp*AI-Verdau). In Spur 1 ist der Wildtyp (CAI-4) mit einer Bandengröße von ca. 7,3 kB zu erkennen. Spuren 2+3 zeigen das Erscheinen einer zusätzlichen Bande durch die 1. Transformation (ca. 7,9 kB). Spuren 4+5 zeigen das Verschwinden der größeren Bande bei gleichzeitigem Erscheinen einer kleineren Bande (ca. 5,5 kB) durch Behandlung der Transformanten mit 5-FOA. Die 2. Transformation in den Spuren 6+7 zeigt das Verschwinden der Wildtyp-Bande. Es bleiben die Transformationsbande (ca. 7,9 kB) und die Bande nach 5-FOA-Behandlung (ca. 5,5 kB) erhalten. Die Spuren 8+9 schließlich zeigen das Verschwinden der 2. Transformationsbande, sodass nur noch die Bande der 5-FOA-Behandlung übrig bleibt. Spuren 2, 4, 6, 8 = Klon 3; Spuren 3, 5, 7, 9 = Klon 15.

Nach der Deletion der beiden Allele folgte noch die Aufhebung der Uridin-Auxotrophie durch Transformation der Mutante mit Clp10 (Murad *et al.*, 2000), einem Vektor der das *URA3*-Gen in den *RPS1*-Lokus (früher *RPS10*) integriert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Integration am *RPS1*-Lokus nur einen minimalen Einfluss auf das phänotypische Verhalten entsprechender Mutanten hat, wohingegen eine andere ektopische Expression zu Unterschieden führen kann (Brand *et al.*, 2004). Die korrekte Integration des *URA3*-Gens in den *RPS1*-Lokus wurde auch durch Southern-Blot bestätigt (nicht gezeigt) und die erhaltene  $\Delta axl1$  + Clp10 Mutanten (im Folgenden nur  $\Delta axl1$  genannt) konnten so mit dem Stamm CAI-4 + Clp10 phänotypisch verglichen werden.

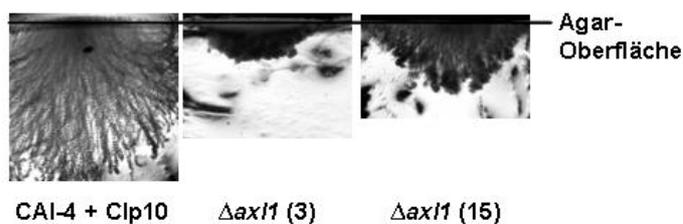
### 3.6.1.2 Phänotypische Charakterisierung von $\Delta axl1$

Wie bereits erwähnt zeigt eine Mutation von *AXL1* in *S. cerevisiae* einen hyperinvasiven Phänotyp (Cullen und Sprague, 2002). Bei der phänotypischen Charakterisierung von  $\Delta axl1$  wurde deshalb besonders das Verhalten auf hypheninduzierenden Medien beobachtet.



**Abb. 3.32:** Phänotypische Charakterisierung von  $\Delta axl1$  auf hypheninduzierenden Medien. (A) Übersicht. (B) Vergrößerung der 10<sup>4</sup>-Konzentration aus (A).

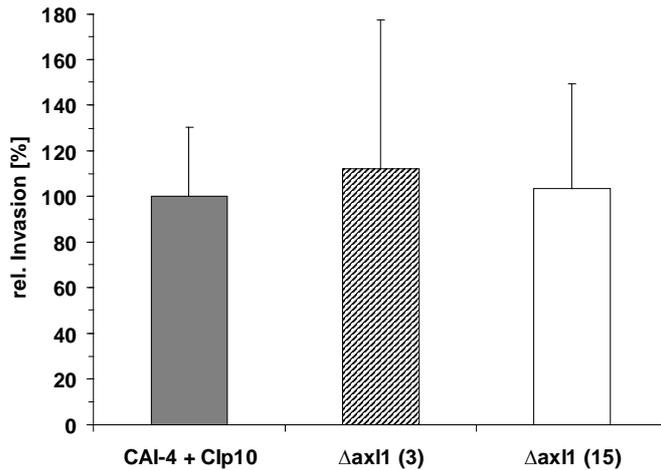
Abbildung 3.32 zeigt, dass  $\Delta axl1$  auf den Medien Spider, 10 % FCS und M199 (pH 8) weniger Hyphen bildet als die Kontrolle CAI-4 + Clp10. Dabei zeigte sich auch, dass die beiden isogenen Mutanten 3 und 15 unterschiedliche Phänotypen hatten. Während  $\Delta axl1$  (3) eine deutliche Abschwächung in der Hypheninduktion zeigte, war die Abschwächung bei  $\Delta axl1$  (15) nur moderat (Abb. 3.32). Weiterhin zeigte sich auf YP-Medium, dass es zwar keinen Unterschied in der grundsätzlichen Invasivität in den Agar gab, es aber einen Unterschied in der Tiefe der Invasion gab (Abb. 3.33).



**Abb. 3.33:** Invasion von  $\Delta axl1$  in YP-Agar. Beide isogenen  $\Delta axl1$  Mutanten waren deutlich weniger invasiv als der Kontrollstamm.

Der Unterschied zwischen den beiden isogenen Mutanten  $\Delta axl1$  (3) und  $\Delta axl1$  (15) war auch hier besonders gut sichtbar.

Nach den Beobachtungen bei der Invasion in YP-Medium, wurde auch untersucht, ob die Mutante einen Defekt bei der Invasion in Matrigel aufweist. Wie Abbildung 3.34 jedoch zeigt, gab es zwischen der Kontrolle und den beiden Mutanten keine signifikanten Unterschiede. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden isogenen Stämmen ausgemacht werden.

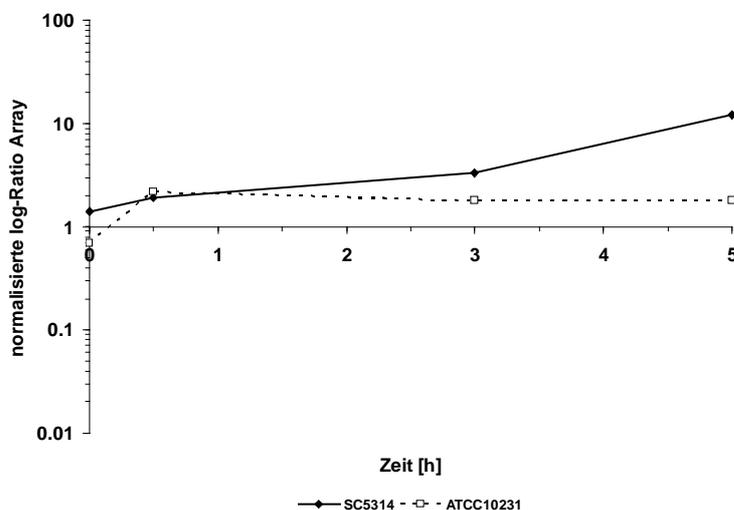


**Abb. 3.34:** Invasion der  $\Delta axl1$  Mutanten in Matrigel im Vergleich zu CAI-4 + Clp10. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen beobachtet.

Neben diesen phänotypischen Analysen wurden die Mutanten auch auf allen weiteren in Tabelle 3.1 beschriebenen Medien getestet. Zusätzlich wurde die Wachstumsrate in Flüssigmedium (YPD) bestimmt. Es konnten jedoch keine weiteren signifikanten Unterschiede zu CAI-4 + Clp10 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da die  $\Delta axl1$  Mutanten keine direkte Abschwächung in der Invasion in Agar bzw. in Matrigel zeigten, wurde auf weitergehende Analysen verzichtet.

### 3.6.2 Charakterisierung von *DFG16*

Ein zweites Gen, welches im Rahmen dieser Arbeit ausführlich charakterisiert wurde, war *DFG16* (*IPF9013*; *orf19.881*). Dieses Gen wurde ausgewählt, da es sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* zu den invasiven Zeitpunkten hochreguliert war und da es stärker in SC5314 exprimiert war als in ATCC10231 (Abb. 3.35).



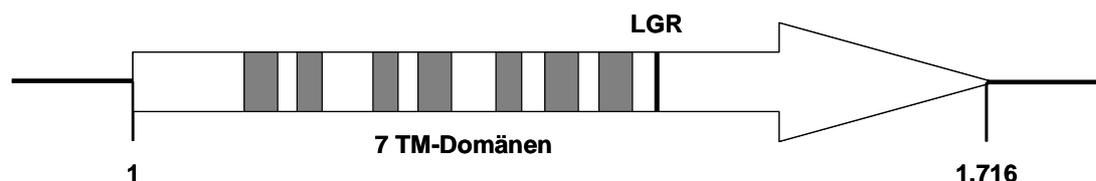
**Abb. 3.35:** *In vivo* Expression von *DFG16* in SC5314 und ATCC10231. Neben der Vorkultur war das Gen in den beiden invasiven Zeitpunkten 3 h und 5 h deutlich stärker in SC5314 als in ATCC10231 exprimiert. Nicht dargestellt ist die stärkere Expression von *DFG16* in SC5314 *ex vivo* im Vergleich zu ATCC10231.

Zum Zeitpunkt der Analyse der Transkriptionsprofile war die Funktion von *DFG16* in *C. albicans* noch unbekannt. Das Gen zeigte jedoch eine Homologie zu *DFG16* aus *S. cerevisiae*. *ScDFG16* wurde in *S. cerevisiae* ursprünglich als Gen identifiziert, dessen Mutation unter Stickstoffmangel zu Defekten im filamentösen Wachstum (*defective for filamentous growth* = *dfg*) der Hefe führte (Mosch und Fink, 1997). Interessanterweise ergaben sich bei dieser Mutante nur Defekte in der Invasion, nicht aber bei der Zellpolarität oder bei der Filamentformation *per se* (Mosch und Fink, 1997). Während der Analyse der Phänotypen von  $\Delta dfg16$  in *C. albicans* wurde weiterhin gezeigt, dass *Dfg16* in *S. cerevisiae* in den Rim101-Signaltransduktionsweg zur Erkennung des externen pH-Wertes involviert ist (Barwell *et al.*, 2005). Und auch in *C. albicans* führte eine *DFG16*-Mutation dazu, dass bei alkalischen pH-Werten keine Hyphen ausgebildet wurden (Barwell *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit hergestellte  $\Delta dfg16$  Mutante wurde dennoch weitergehend phänotypisch untersucht und es wurde neben der Lokalisation von *Dfg16* in der Zelle auch Transkriptionsprofile der Mutante bei alkalischen pH-Werten erstellt.

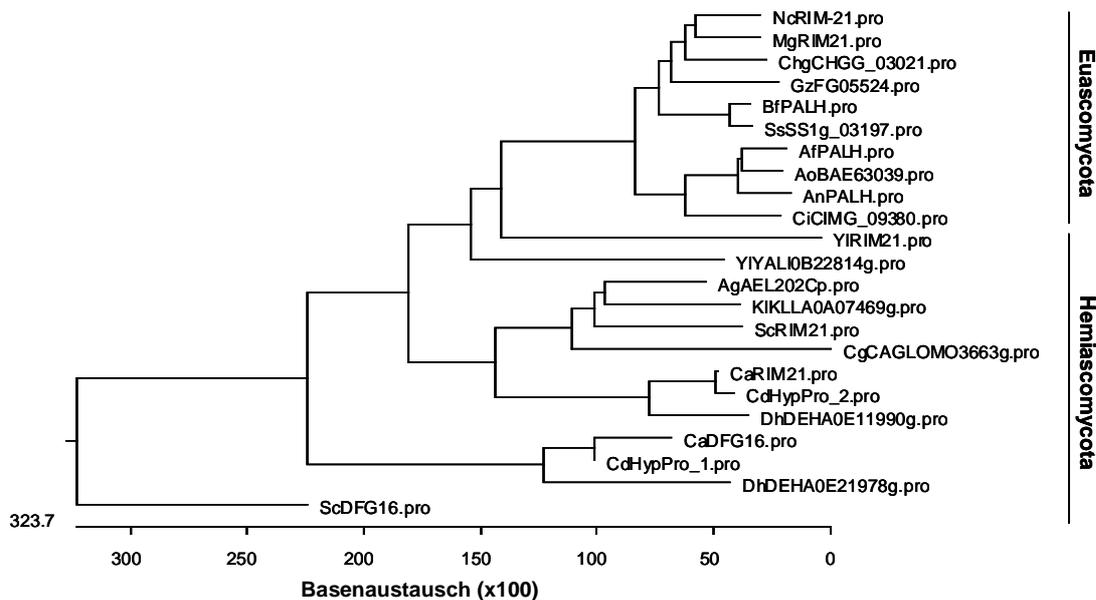
### 3.6.2.1 Genstruktur und Homologie zu anderen Proteinen

*C. albicans DFG16* liegt im Genom auf Chromosom 2 zwischen *orf19.880* (unbekannte Funktion) und *HSP78*, einem Gen, welches für ein Hitzeschockprotein codiert. *DFG16* umfasst 1.716 Basenpaare, welche für ein putatives Membranprotein mit sieben Transmembrandomänen codieren (Abb. 3.36). Neben diesen Transmembrandomänen enthält die Proteinsequenz von *Dfg16* ein hoch konserviertes LGR-Motiv (siehe unten). Die 572 Aminosäuren von *Dfg16* haben ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 66 kDa.



**Abb. 3.36:** Genomische Struktur von *DFG16*. Neben den sieben Transmembran- (TM-) Domänen (graue Bereiche) weist die Sequenz einen langen 3'-Bereich mit einem konservierten LGR-Motiv (schwarzer Balken) auf. Größenangaben in bp.

Die genomische bzw. die daraus abgeleitete Proteinstruktur lässt vermuten, dass es sich bei Dfg16 vermutlich um ein Transmembranprotein handelt. Dfg16 zeigt die stärkste Homologie zu Dfg16 aus *S. cerevisiae*. Bei einer BLAST-Analyse in den bisher sequenzierten fungalen Genomen wurden weitere Homologe in anderen Pilzen gefunden, u. a. PalH von *Aspergillus nidulans*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Dfg16 mit Rim21 sowohl in *C. albicans* als auch in *S. cerevisiae* ein Homolog besitzt. Die verwandtschaftlichen Verhältnisse der einzelnen Proteine sind in Abbildung 3.37 wiedergegeben.



**Abb. 3.37:** Phylogenie der CaDfg16-Homologe. In den Genomen der hier aufgelisteten Arten wurde nach Homologen von Dfg16 und Rim21 gesucht. Nc = *Neurospora crassa*; Mg = *Magnaporthe grisea*; Chg = *Chaetomium globosum*; Gz = *Gibberella zeae*; Bf = *Botrytis fuckeliana*; Ss = *Sclerotinia sclerotiorum*; Af = *Aspergillus fumigatus*; Ao = *Aspergillus oryzae*; An = *Aspergillus nidulans*; Ci = *Coccidioides immitis*; Yl = *Yarrowia lipolytica*; Ag = *Ashbya gossypii*; Kl = *Kluyveromyces lactis*; Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; Cg = *Candida glabrata*; Ca = *Candida albicans*; Cd = *Candida dubliniensis*; Dh = *Debaryomyces hansenii*.

Neben den Genomen der in Abbildung 3.37 aufgeführten Arten wurden weitere Genome der Basidiomyceten und Zygomyceten auf Homologe von Dfg16 und Rim21 analysiert. Es konnten jedoch nur Homologe in Ascomyceten, und hier auch nur innerhalb der Eu- und Hemiascomyceten, gefunden werden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Dfg16- und Rim21-Homologe zusammen nur in den *Saccharomyces sensu stricto*-Arten (Daten nicht gezeigt), *D. hansenii*, *C. dubliniensis* und *C. albicans* zu finden waren (Abb. 3.37). Alle weiteren Pilzarten enthielten nur ein Protein, welches entweder zu Dfg16 oder Rim21 homolog ist.

Herranz *et al.* konnten zeigen, dass in *A. nidulans* PalF an ein konserviertes LGR-Motiv von PalH, welches auch in Rim21 von *C. albicans* zu finden ist, binden kann und somit das pH-Signal über den Endocytoseweg an PacC übermittelt werden kann (Herranz *et al.*, 2005). Da für den Rim101-Signaltransduktionsweg in *C. albicans* ein ähnlicher Mechanismus vermutet wird und ein solches Motiv in Rim21 gefunden wurde, wurde auch in der Proteinsequenz von Dfg16 nach dem LGR-Motiv gesucht. Wie in Abbildung 3.38 zu erkennen ist, besitzt CaDfg16 auch ein LGR-Motiv und dieses Motiv ist in allen untersuchten Pilzarten hoch konserviert. Dabei ist auch der Abstand zur letzten Transmembrandomäne identisch. Man kann für *C. albicans* damit die Hypothese aufstellen, dass dieses Motiv vermutlich auch essentiell für die Bindung des PalF-Homologen Rim8 ist.

AfPalH	WEWVERIEALERDERKDGILGRELFDGDE	377
AgAEL202C	WEWSNRLSILEARRQAQSILGRPVEDE-	358
AnPalH	WEWVERIEALERDERKDGILGREVFDGDE	377
AoBAE63039	WEWVERIEALERDERKDGILGREIFDGDE	377
BfPalH	WEWVERIEALERDEKKGVLGREVFDGDE	372
CaDfg16	WEWIFNIWVIEKRIELMGVLGRRISIDDV	341
CaRim21	WEWCNKFNLIMKAKEKEGVLGRRFYEDEL	349
CgCAGLOMO3663g	WEWLERIHILKAAQVKSILGQKIYEDEQ	360
ChgCHGG_03021	WEWVERIEALEREKKGILGREVFDGDE	389
CiCIMG_09380	WEWVERIEALEREERKDGILGREIFDGDE	476
DhDEHA0E21978g	WEWVYGIEFLEKRYEIMGMLGRRISLNDV	361
GzFG05524.1	WEWVERIEALEREKKGILGREVFDGDD	388
KlNRRL_Y-1140	LEWTNRIHTMERKIHAASVLGRPIYEDE-	354
MgRim21	WEWVERIEALEREKRNGLGREVFDGDE	387
NcRim-21	WEWVERIEALEREKKGILGREVFDGDE	390
ScDfg16	WGLIGVLEKRELHISKKTVLGRKINNRDK	454
ScRim21	WEWLDRLNVLERKEEAQSILGRPIFEEE-	355
SsSS1g_03197.1	WEWVERIEALERDEKKGVLGREVFDGDE	372
YlRim21	WEWTNVIVYQERREQRQSVLGRQVYRDEI	373

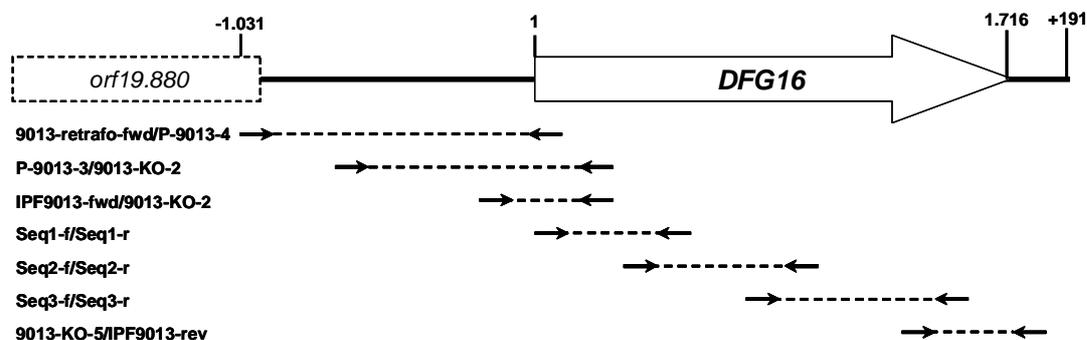
letzte TM-Domäne
PalF/Rim8 Bindung

**Abb. 3.38:** Sequenzvergleich der Dfg16/Rim21-Homologe aus verschiedenen Pilzarten. Nur der Bereich mit dem konservierten LGR-Motiv ist dargestellt. Stark konservierte Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, schwach konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Das WEW-Motiv kennzeichnet einen konservierten Bereich der letzten Transmembrandomäne. Die Namen der Proteine entsprechen den Namen der Abb. 3.37. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der letzten dargestellten Aminosäure.

### 3.6.2.2 Vergleich der DFG16-Sequenzen aus SC5314 und ATCC10231

Da *DFG16* in Stamm SC5314 als differentiell exprimiert im Vergleich zu Stamm ATCC10231 identifiziert worden war, stellte sich die Frage, ob der Promotorbereich des Gens in den beiden Stämmen Unterschiede aufweist und ob der codierende Bereich von *DFG16* in den beiden Stämmen Unterschiede aufweist, so dass es zu einer Fehlregulation bzw. zu einem eventuellen Funktionsverlust des Gens bzw. des Proteins in ATCC10231 gekommen war. Um diese Frage zu beantworten wurde der codierende Bereich von *DFG16* in SC5314 und ATCC10231 sequenziert. Zusätzlich wurde der Promotor bis -1.031 und der 3'-nicht-translatierte Bereich bis +191 in beiden Stämmen sequenziert. Als Referenz diente die publizierte Genomsequenz von *DFG16* (aus SC5314; [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)).

Für die Sequenzierung wurde genomische DNA aus beiden Stämmen isoliert, Abschnitte mittels PCR amplifiziert, in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert und mit Hilfe des M13-Primers (fwd und rev) wurde das Insert sequenziert. Abbildung 3.39 gibt eine Übersicht über die Sequenzierstrategie und die verwendeten Primer wieder. Der sequenzierte Bereich aus ATCC10231 wurde in GenBank (Benson *et al.*, 2006) unter der Zugangsnummer DQ533686 hinterlegt.

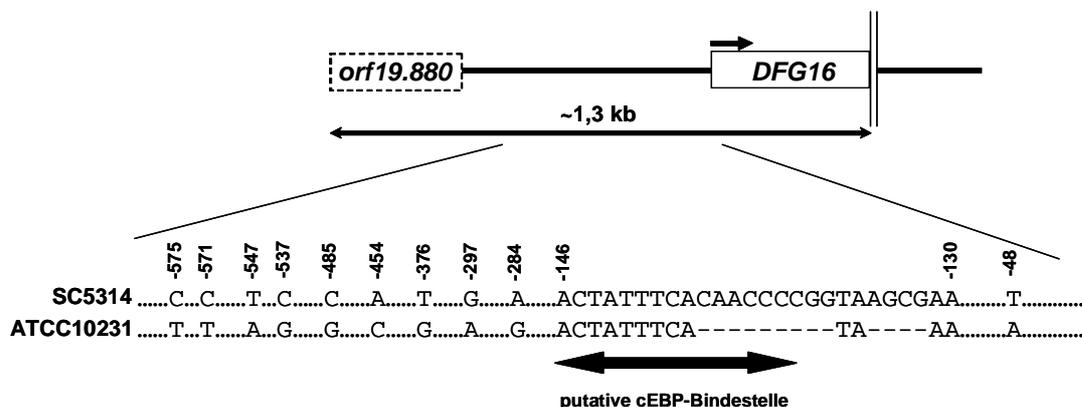


**Abb. 3.39:** *DFG16*-Sequenzierstrategie. Mit den angegebenen Primerpaaren wurden die entsprechenden Genabschnitte aus SC5314 und ATCC10231 amplifiziert und sequenziert. Jedes Fragment wurde dabei beidseitig sequenziert.

Obwohl die publizierte Genomsequenz von *C. albicans* in SC5314 ermittelt wurde, wurde *DFG16* auch in SC5314 noch einmal sequenziert. Dies hatte den Vorteil, dass es somit eine zusätzliche Kontrolle der Sequenz gab. So reichte es aus, die Abschnitte von -1.031 bis -666 und von 1.441 bis +191 in einfacher Absicherung zu sequenzieren, da es in diesen Bereichen keine Unterschiede zwischen SC5314 und

ATCC10231 gab. Der restliche Bereich der Sequenz wurde mindestens zweimal pro Stamm bestimmt (Abb. 3.39).

In dem codierenden Bereich von *DFG16* gab es zwischen den beiden Stämmen fünf Basenaustausche. Dies führte zu fünf Aminosäure-austauschen bei AS 277 (SC5314 Isoleucin => ATCC10231 Threonin), AS 325 (SC5314 Lysin => ATCC10231 Arginin), AS 382 (SC5314 Threonin => ATCC10231 Alanin), AS 459 (SC5314 Tyrosin => ATCC10231 Histidin) und AS 518 (SC5314 Prolin => ATCC10231 Serin). Die letzten vier AS-Austausche liegen im putativen cytosolischen C-Terminus des Proteins. Das konservierte LGR-Motiv, welches vermutlich für die Signaltransduktion essentiell ist, war jedoch nicht betroffen. Es ist somit davon auszugehen, dass ein funktioneller Unterschied in der Enzymaktivität in den beiden Stämmen eher unwahrscheinlich ist. Die Analyse der Promotorsequenz aus ATCC10231 zeigte 10 Basenaustausche im Vergleich zu SC5314 (Abb. 3.40). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ATCC10231 im Promotor zwei größere Deletionen zwischen den Basen -146 und -130 aufwies (Abb. 3.40). Eine Analyse der Promotorsequenz auf putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der MAPPER-Datenbank (Marinescu *et al.*, 2005) zeigte, dass genau in dieser Region des Promotors eine putative Bindestelle für ein *Enhancer Binding Protein* (cEBP) liegt.

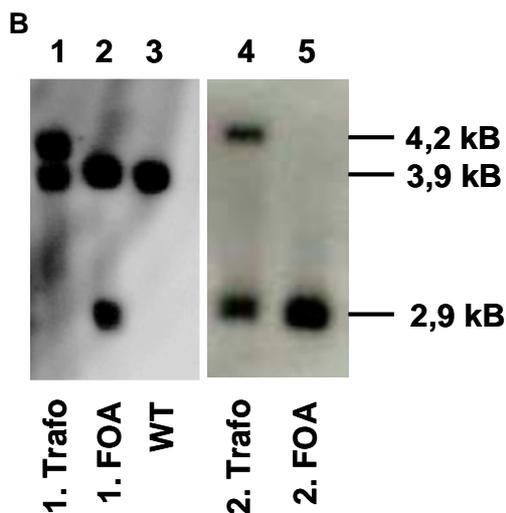
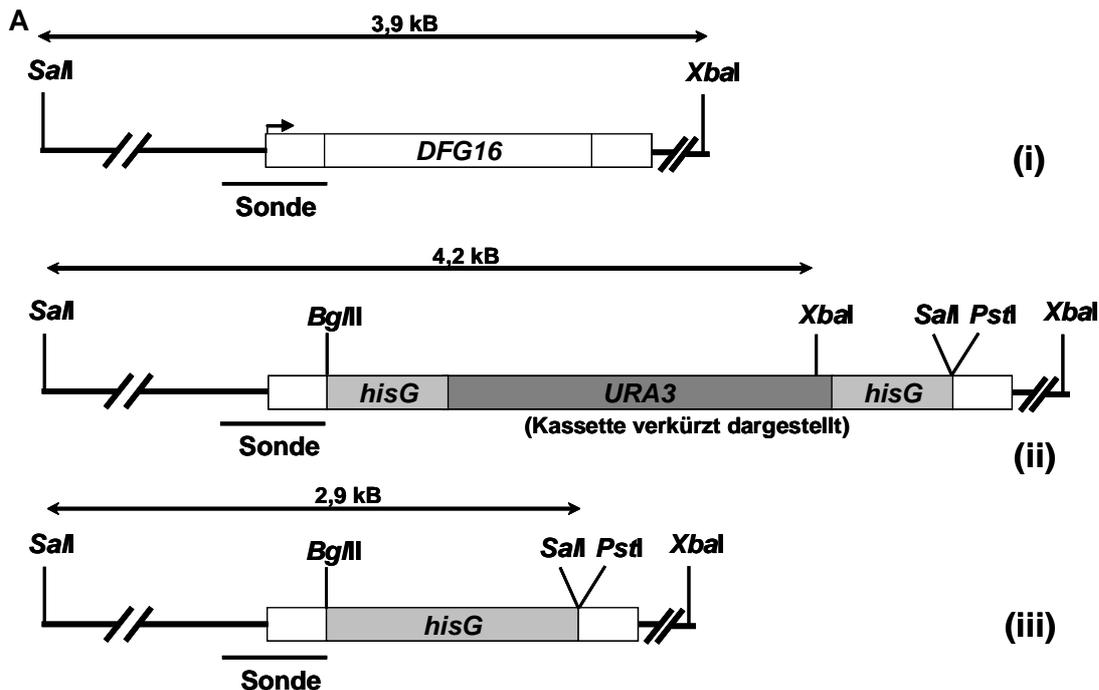


**Abb. 3.40:** Promotoranalyse von *DFG16* in SC5314 und ATCC10231. Neben einzelnen Basenaustauschen sind vor allem die beiden größeren Deletionen im *DFG16*-Promotor von ATCC10231 auffällig.

### 3.6.2.3 Herstellung einer Disruptionskassette und Deletion von *DFG16*

Für die Deletion von *DFG16* wurde ebenfalls das Ura-Blaster Protokoll angewandt. Für die Konstruktion des Disruptionsvektor wurde zunächst der gesamte codierende

Bereich von *DFG16* inklusive eines 5'- und eines 3'-nicht translatierten Bereichs von -199 bis +193 mit den Primern IPF9013-fwd und IPF9013-rev mittels PCR amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. Es folgte eine inverse PCR mit den Primern 9013-KO-2 und 9013-KO-5, das Fragment wurde mit *Bgl*II und *Pst*I verdaut und mit dem *Bgl*II/*Pst*I-verdauten 3 kB *hisG-URA3-hisG* Fragment aus pMB-7 ligiert um pKO-DFG16 zu erhalten.



**Abb. 3.41:** Southern-Blot Analyse der Deletion von *DFG16*. **(A)** Schematische Darstellung der zu erwartenden Bandengrößen. Die verwendete Sonde für den Southern-Blot war identisch mit der vorderen Flanke der Deletionskassette. (i) Bandengröße im Wildtyp-Allel. (ii) Größe der Bande nach Transformation. (iii) Bandengröße nach 5-FOA Behandlung. Die Größenrelationen stimmen nicht überein. **(B)** Southern-Blot (*Sal*I/*Xba*I-Verdau). In Spur 3 ist der Wildtyp (CAI-4) mit einer Bandengröße von ca. 3,9 kB zu erkennen. Spur 1 zeigt das Erscheinen einer zusätzlichen Bande durch die 1. Transformation (ca. 4,2 kB). Spur 2 zeigt das Verschwinden der größeren Bande bei gleichzeitigem Erscheinen einer kleineren Bande (ca. 2,9 kB) durch Behandlung der Transformanten mit 5-FOA. Die 2. Transformation in Spur 4 zeigt das Verschwinden der Wildtyp-Bande. Es bleiben die Transformationsbande (ca. 4,2 kB) und die Bande nach 5-FOA-Behandlung (ca.

2,9 kB) erhalten. Spur 5 schließlich zeigt das Verschwinden der 2. Transformationsbande, so dass nur noch die Bande der 5-FOA-Behandlung übrig bleibt.

Die Deletion von *DFG16* erfolgte in CAI-4 nach einem modifizierten Protokoll von Walther und Wendland (Walther und Wendland, 2003). Eine korrekte Integration der Deletionskassette wurde mittels Southern-Blot überprüft. Abbildung 3.41 zeigt eine schematische Übersicht und die Southern-Blot Analyse.

Entsprechend der  $\Delta ax1$  Mutante folgte nach der Disruption der beiden *DFG16*-Allele eine Transformation mit Clp10, um die Uridin-Auxotrophie aufzuheben. Der phänotypische Vergleich der so erhaltenen  $\Delta dfg16$  Mutante erfolgte zu CAI-4 + Clp10.

#### **3.6.2.4 Herstellung von Retransformanten von $\Delta dfg16$**

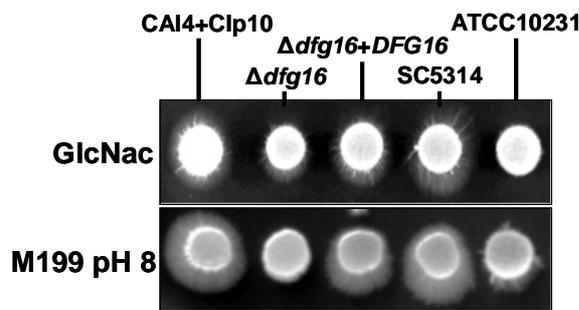
Phänotypen einer Mutante können zweifellos auf die Deletion eines Gens zurückgeführt werden, wenn die Reintegration dieses Gens in die jeweilige Mutante den beobachteten Phänotyp aufheben kann (Molekulare Koch'sche Postulate (Falkow, 1988)).

Da die  $\Delta dfg16$  Mutante intensiver charakterisiert wurde und auch stärkere Phänotypen zeigte (s.u.) als die  $\Delta ax1$  Mutante, wurde das native *DFG16*-Gen in die  $\Delta dfg16$  Mutante reintegriert. Dazu wurde das gesamte *DFG16*-Gen inklusive Promotor und Terminator von -1.031 bis +293 durch PCR mit den Primern 9013-retrafo-fwd und 9013-retrafo-rev amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. Nach einem Verdau des Vektors mit *KpnI/XhoI* wurde das gewonnene Fragment in den entsprechend verdauten Vektor Clp10 kloniert. Das so erhaltene Plasmid Clp10-*DFG16* wurde linearisiert und in die  $\Delta dfg16$  Mutante transformiert. Die Integration von *DFG16* erfolgte hierbei am *RPS1*-Lokus. Eine korrekte Integration des Plasmids wurde mittels PCR und Southern-Blot überprüft. Die so erhaltenen Transformanten  $\Delta dfg16 + DFG16$  wurden mit der  $\Delta dfg16$  Mutante verglichen.

#### **3.6.2.5 Phänotypische Charakterisierung von $\Delta dfg16$**

Für die phänotypischen Charakterisierungen wurden zunächst die Medien/Bedingungen aus Tabelle 3.1 getestet. Die Mutante zeigte jedoch auf keinem dieser Medien einen phänotypischen Unterschied im Vergleich zu CAI-4 + Clp10 (Daten nicht gezeigt). Auch das Wachstum in Flüssigmedium war nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

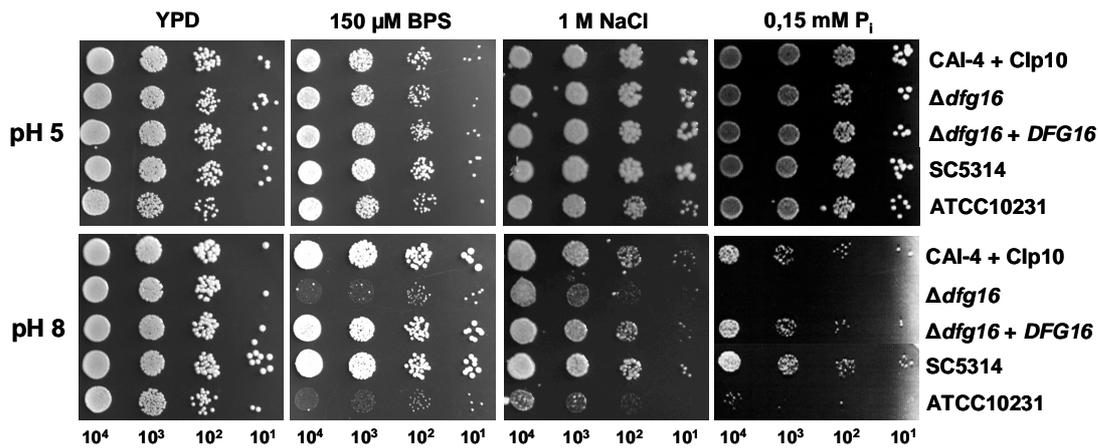
Barwell *et al.* konnten bereits zeigen, dass  $\Delta dfg16$  einen Defekt in der Hyphenbildung unter alkalischen Bedingungen aufweist (Barwell *et al.*, 2005). Dieser Defekt wurde mit den in dieser Arbeit hergestellten Mutanten bestätigt. Andere hypheninduzierende Medien wie z.B. Medium mit N-Acetyl-glucosamin (GlcNac) zeigten jedoch keinen Unterschied zur Kontrolle (Abb. 3.42).



**Abb. 3.42:** Phänotypen von  $\Delta dfg16$  auf Hypheninduzierenden Medien. Neben CAI-4 + Clp10 und der Retransformante  $\Delta dfg16 + DFG16$  wurden als zusätzliche Kontrollen SC5314 und ATCC10231 verwendet.

Interessanterweise waren die Phänotypen der  $\Delta dfg16$  Mutante ähnlich aber nicht identisch mit den Phänotypen von ATCC10231. So zeigte die Mutante auf GlcNac-Medium eine verminderte Hyphenbildung im Vergleich zu CAI-4 + Clp10 und SC5314, ATCC10231 hingegen war nicht in der Lage hier Hyphen zu bilden (Abb. 3.42; vgl. auch 3.1). Auf dem alkalischen Medium waren die Verhältnisse genau umgekehrt: während ATCC10231 verminderte Hyphenbildung zeigte, war die Mutante nicht in der Lage Hyphen bei pH 8 auszubilden (Abb. 3.42).

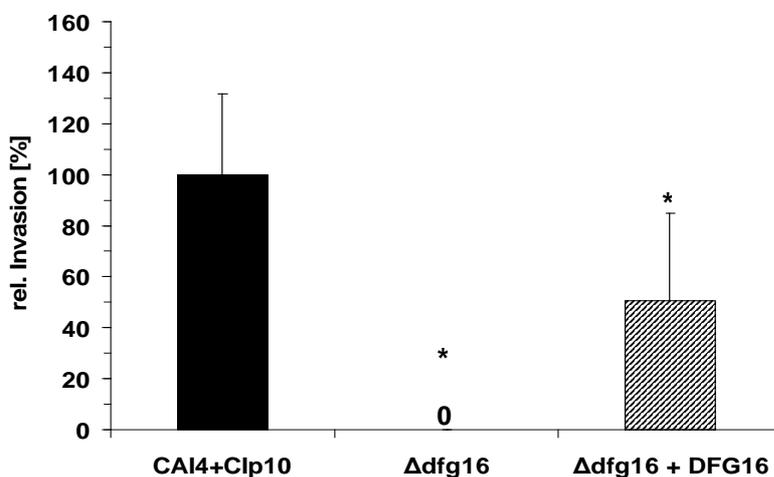
Da von Barwell *et al.* gezeigt werden konnte, dass *DFG16* Bestandteil des Rim101-pH-Signaltransduktionswegs ist (Barwell *et al.*, 2005), wurden weitere Medien getestet, von denen bekannt war, dass Mutanten von Komponenten des Rim101-Signaltransduktionswegs phänotypische Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Dazu gehörten Medien mit einer erhöhten Kationenkonzentration (NaCl (Lamb *et al.*, 2001)) und mit verminderter Eisenkonzentration durch Zugabe des Eisen-Chelators Bathophenanthrolin-Disulfonat (BPS (Bensen *et al.*, 2004)). Die Mutante wurde dabei unter sauren (pH 5) und alkalischen (pH 8) Bedingungen getestet. Da SC5314 und ATCC10231 bisher nicht auf diesen Medien getestet worden sind, dienten diese beiden Stämme erneut als zusätzliche Kontrollen. Weiterhin wurde auch das Wachstum der Mutante unter Phosphat-limitierenden Bedingungen getestet, da das Transkriptionsprofil der  $\Delta dfg16$  Mutante auf einen Zusammenhang zwischen pH und Phosphat-Metabolismus hindeutete (siehe unten).



**Abb. 3.43:** Analyse der  $\Delta dfg16$  Mutante und Revertante auf verschiedenen Medien bei pH 5 bzw. pH 8. Die Medien wurden mit HEPES gepuffert und der entsprechende pH-Wert eingestellt. Der pH-Wert unter Phosphat-limitierenden Bedingungen wurde ohne Puffer eingestellt. Als Kontrollen dienen CAI-4 + Clp10, SC5314 und ATCC10231.

Wie in der Abbildung 3.43 zu erkennen ist, zeigte die Mutante bei pH 5 auf allen vier dargestellten Medien keinen Wachstumsunterschied zu der Kontrolle. Auch auf YPD bei pH 8 war kein Unterschied zu erkennen. Die  $\Delta dfg16$  Mutante zeigte jedoch sowohl unter Eisen- und Phosphat-limitierenden Bedingungen sowie unter erhöhter Kationenkonzentration einen deutlichen Wachstumsdefekt bei pH 8. Die Revertante konnte all diese Defekte wieder aufheben. Interessanterweise zeigte ATCC10231 die gleichen Wachstumsdefekte bei pH 8.

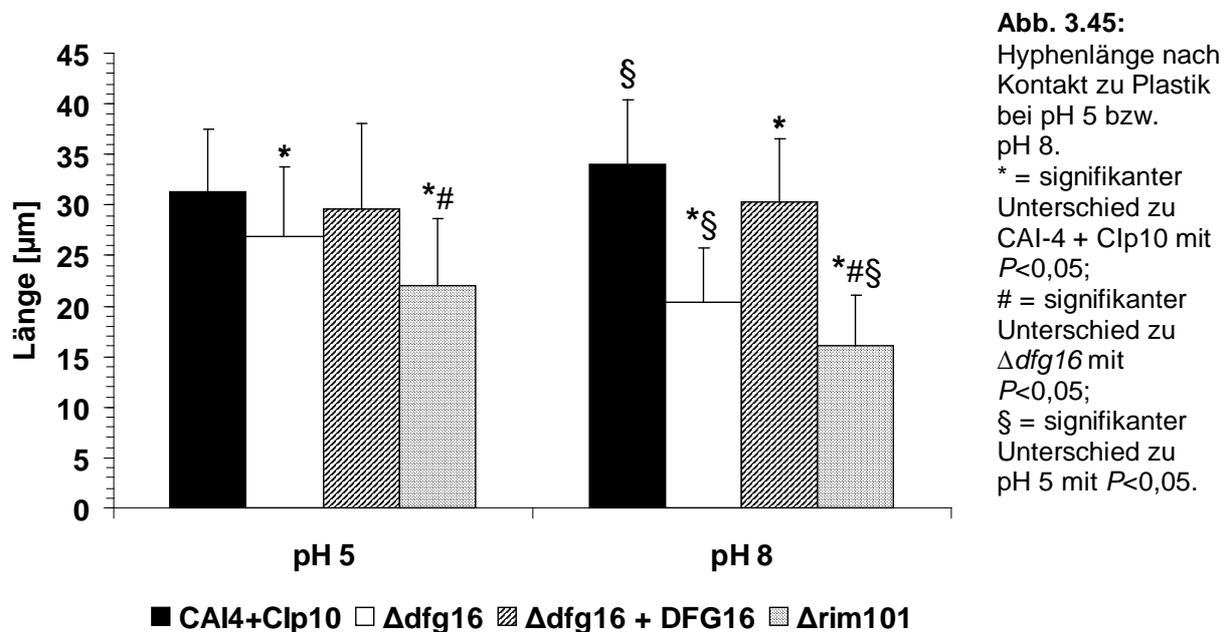
Da ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit die Untersuchung der Invasion von *C. albicans* in eine Matrix war, wurde die  $\Delta dfg16$  Mutante auch im Matrigel-Invasionsassay getestet. Wie die Abbildung 3.44 zeigt, war die Mutante nicht in der Lage, durch das Matrigel zu migrieren. Eine mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die Mutante im Gegensatz zu CAI-4 + Clp10 auf dem Matrigel in DMEM (pH 8) keine Hyphen ausbildete (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.44:** Invasion in Matrigel von  $\Delta dfg16$ . Die Mutante war nicht in der Lage, durch das Matrigel zu migrieren. Die Revertante konnte diesen Phänotyp zumindest teilweise aufheben. \* = signifikanter Unterschied zu CAI-4 + Clp10 mit  $P < 0,05$ .

In der Abbildung 3.44 ist weiterhin zu erkennen, dass die Revertante den Phänotyp von  $\Delta dfg16$  nur zu ca. 60 % aufheben konnte. Es wurden mehrere isogene Revertanten getestet, aber keine war in der Lage, den Phänotyp noch weiter aufzuheben. Alle anderen Phänotypen, die die  $\Delta dfg16$  Mutante zeigte, konnten durch die Revertante fast vollständig wieder aufgehoben werden. Ein Gendosis- oder Positionseffekt für *DFG16* kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Punkt der phänotypischen Charakterisierung befasste sich mit der Hyphenbildung. Es wurde dabei untersucht, ob es einen Unterschied in der Hyphenlänge nach einer Kontaktinduktion durch eine hydrophobe Plastikoberfläche bei verschiedenen pH-Werten gab. Dazu wurden Zellen der zu untersuchenden Stämme in M199 pH 5 bzw. M199 pH 8 resuspendiert und für 4 h in einem Plastikgefäß inkubiert. Die Hyphenlänge wurde anschließend mikroskopisch ermittelt. Neben der Mutante und den zugehörigen Wildtyp- und Revertante-Kontrollen wurde hier auch die  $\Delta rim101$  Mutante (Wilson *et al.*, 1999) getestet. Von dieser Mutante wurde bereits gezeigt, dass sie noch in der Lage ist, nach Kontakt mit Epithelzellen Hyphen zu bilden (Villar *et al.*, 2005). Hier lag jedoch das Augenmerk vor allem auf der Hyphenlänge im Vergleich zu den anderen Stämmen. Abbildung 3.45 gibt die Hyphenlänge bei verschiedenen pH-Werten wieder.



Wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, waren die Hyphen der Mutanten bei pH 5 signifikant kürzer als die des Wildtyps oder der Retransformante. Bei pH 8 war die Hyphenlänge der Mutanten kürzer als die der Kontrollen. Zusätzlich war zu

erkennen, dass nur der Wildtyp in der Lage war im Vergleich zu pH 5 längere Hyphen auszubilden. Die Retransformante zeigte keinen Unterschied zwischen pH 5 und pH 8 während  $\Delta dfg16$  und  $\Delta rim101$  sogar signifikant kürzere Hyphen bei pH 8 als bei pH 5 ausbildeten. Interessanterweise war die Hyphenlänge von  $\Delta rim101$  bei beiden pH-Werten signifikant kürzer als die von  $\Delta dfg16$ . Diese Ergebnisse zeigten, dass der Defekt in der pH-abhängigen Hyphenbildung bei  $\Delta dfg16$  durch den Kontakt zu einer hydrophoben Oberfläche nur teilweise aufgehoben werden konnte. Weiterhin zeigte dieses Ergebnis, dass der Defekt der  $\Delta rim101$  Mutante stärker ist als der Defekt von  $\Delta dfg16$ .

Nach diesen ersten Ergebnissen wurde im Weiteren die Lokalisation von Dfg16 in der Zelle und die Interaktion der Mutante mit Wirtszellen *in vitro* und *in vivo* untersucht.

#### 3.6.2.6 Lokalisation von Dfg16

Für die Analyse der Lokalisation von Dfg16 in der *C. albicans* Zelle, wurde *DFG16* mit einem modifizierten Gen für das grün fluoreszierenden Protein (*GFP*) aus *Aequorea victoria* fusioniert und hinter den konstitutiv exprimierten *ACT1*-Promotor aus *C. albicans* kloniert. Die Fusion von Dfg16 und Gfp erfolgte in Anlehnung an Shukla *et al.* (Shukla *et al.*, 2003) C-terminal.

Dazu wurde zunächst der Actin-Promotor mit den Primern P-ACT1-fwd und P-ACT1-rev amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. *DFG16* wurde mit den Primern IPF9013-Fus1 und IPF9013-Fus2 amplifiziert und ebenfalls in pCR2.1-TOPO kloniert. Bei der Amplifikation von *DFG16* wurde dabei gleichzeitig das Stopp-Codon entfernt, so dass bei der Translation über die *DFG16*-mRNA hinaus das fusionierte *GFP*-Transkript abgelesen werden konnte. Das modifizierte *GFP*-Gen wurde für die spätere Fusion zunächst mit den Primern GFP-1 und GFP-2 aus pGFP (Barelle *et al.*, 2004) amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. GFP-1 enthielt eine dreifache Sequenz für Glycin (GGT), um einen Linker zwischen *DFG16* und *GFP* zu schaffen. Dadurch sollte die korrekte Faltung der beiden Fusionsproteine ermöglicht werden.

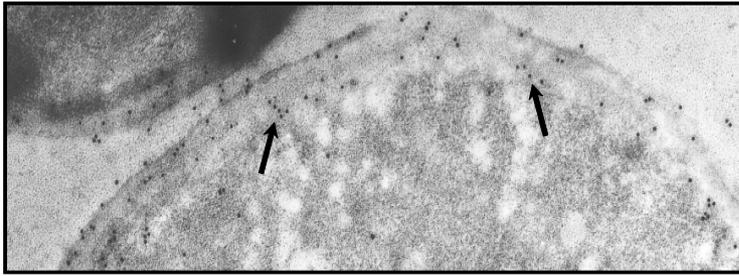
Für die Fusion der einzelnen Komponenten wurde anschließend der *ACT1*-Promotor und *DFG16* aus pCR2.1-TOPO mit *XhoI* und *XbaI* bzw. mit *XbaI* und *SphI* herausgeschnitten, die geschnittenen Fragmente wurden ligiert und der Liagtionsansatz wurde mittel PCR mit den Primern P-ACT1-fwd und IPF9013-Fus2

amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. Das so entstandene Promotor-Gen-Fragment wurde mit *XhoI* und *SphI* aus pCR2.1-TOPO herausgeschnitten und mit dem *SphI/NheI*-verdauten *GFP* ligiert. Auch dieser Ligationsansatz wurde mittels PCR mit den Primern P-ACT1-fwd und GFP-2 amplifiziert und das Fragment wurde zunächst wieder in pCR2.1-TOPO kloniert. Schließlich wurde das Fusionsprodukt mit *XhoI* und *NheI* herausgeschnitten und in den entsprechend verdauten Vektor pGFP (Barelle *et al.*, 2004) kloniert. Das Konstrukt konnte somit in den *RPS1*-Lokus von *Candida albicans* integriert werden. Die korrekte Integration wurde mittels PCR und Southern-Blot überprüft (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.46 gibt eine schematische Übersicht über die Fusion wieder.



**Abb. 3.46:** Schematische Übersicht über das *DFG16-GFP*-Fusionsfragment (inkl. *ACT1*-Promotor und Glycin-Linker).

Nach der Transformation wurde mit verschiedenen Mitteln probiert, die Lokalisation zu bestimmen. Da das Fusionsprotein im Mikroskop nicht fluoreszierte und auch die Bestimmung der Lokalisation durch Auftrennung und anschließender Analyse der verschiedenen zellulären Fraktionen (Zellwand/Membran, Cytosol) mittels Western-Blot nicht eindeutig war, wurde das Fusionsprotein mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie detektiert. Dazu wurden Dünnschnitte von Transformanten mit einem Kaninchen anti-Gfp-Antikörper inkubiert und anschließend mit einem anti-Kaninchen IgG-Antikörper, welcher an ein Goldpartikel gekoppelt war, hybridisiert. Die Lage innerhalb der *C. albicans* Zelle konnte daraufhin im Elektronenmikroskop bestimmt werden. Als Kontrollen wurden *C. albicans* Stämme eingesetzt, die das Gfp-Protein enthalten aber nicht exprimieren (CAI-4 + pGFP (Fradin *et al.*, 2005)) und die das Gfp konstitutiv exprimieren wobei das Protein cytosolisch vorliegt (CAI-4 + pACT1-GFP (Fradin *et al.*, 2005); Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.47:** Lokalisation von Dfg16 in der Zelle. Die Pfeile zeigen, dass das Fusionsprotein Dfg16-Gfp hauptsächlich an der Zelloberfläche in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Die Abbildung 3.47 zeigt deutlich, dass das Fusionsprotein an der Zelloberfläche und dort primär in der Plasmamembran lokalisiert war. Dies bestätigte die Annahme, dass Dfg16 aufgrund seiner sieben putativen Transmembrandomänen tatsächlich ein Membranprotein ist.

### 3.6.2.7 Transkriptionsprofil von $\Delta dfg16$ unter alkalischen Bedingungen

Basierend auf der Beobachtung, dass Dfg16 sieben putative Transmembrandomänen besitzt und tatsächlich in der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 3.47), kann postuliert werden, dass Dfg16 ein Rezeptor ist. Die Ergebnisse von Barwell *et al.* (Barwell *et al.*, 2005) und die bisher hier dargestellten Ergebnisse unterstützen diese Vermutung. Sollte Dfg16 nun tatsächlich in den Rim101-Signaltransduktionsweg eingebunden sein, so müsste sich eine Mutation in der Transkription von pH-regulierten Genen widerspiegeln. Deshalb wurden die Transkriptionsprofile des Kontrollstamms CAI-4 + Clp10 und der  $\Delta dfg16$  Mutante unter milden alkalischen Bedingungen miteinander verglichen. Dazu wurden CAI-4 + Clp10 und  $\Delta dfg16$  in YPD-Medium gepuffert bei pH 5 angezogen und in YPD-Medium gepuffert bei pH 7,4 überführt. Da die Inkubation (4 h) zusätzlich bei 37 °C erfolgte, konnten sowohl die Temperatur als auch der pH-Wert als physiologisch angesehen werden.

Im Vergleich zur Kontrolle waren in der  $\Delta dfg16$  Mutante 61 Gene differentiell exprimiert (30 hoch-, 31 runterreguliert; Tabelle 3.7). Von diesen 61 Genen besaßen 18 (29,5 %) eine putative Rim101-Bindestelle (Ramon und Fonzi, 2003) in ihrem Promotor. Zum Vergleich besitzen nur 11,7 % aller Gene im *C. albicans* Genom eine putative Rim101-Bindestelle in ihrem Promotor.

**Tabelle 3.7:** Differenziell exprimierte Gene in der  $\Delta dfg16$  Mutante nach Inkubation für 4 h bei 37 °C und pH 7,4.

Name <sup>a</sup>	orf19-Nr.	Beschreibung	Normalisierte Ratio <sup>b</sup>	P-Wert <sup>c</sup>	Rim101 Bindestelle <sup>d</sup>
<b>Hochreguliert</b>					
<i>IPF300</i>	orf19.3282	unbekannte Funktion	2,4	1,63E-04	
<i>HSP12</i>	orf19.3160	Hitzeschockprotein (aufgrund von Homologie)	2,3	1,73E-04	
<i>STL1</i>	orf19.5753	Zucker Transporter (aufgrund von Homologie)	2,5	1,98E-04	+
<i>IFN1</i>	orf19.1979	Glycerophosphoinositol Transporter (aufgrund von Homologie)	2,3	2,27E-04	
<i>IPF13836</i>	orf19.2344	Putatives Hitzeschockprotein (aufgrund von Homologie)	2,1	5,16E-04	
<i>IPF11888</i>	orf19.5180	unbekannte Funktion	2,0	6,56E-04	
<i>IPF2232</i>	orf19.6899	unbekannte Funktion	2,1	8,74E-04	
<i>KRE1</i>	orf19.4377	Protein des sekretorischen Pfads	1,9	8,90E-04	
<i>SOD1</i>	orf19.2770	Cu,Zn-Superoxid Dismutase	2,0	0,002	
<i>DDR48</i>	orf19.4082	Stressprotein (aufgrund von Homologie)	1,9	0,002	
<i>IPF8746</i>	orf19.4279	putative $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferase (aufgrund von Homologie)	2,3	0,002	
<i>PGA20</i>	orf19.535	unbekannte Funktion	2,3	0,003	
<i>IPF3485</i>	orf19.6757	Aldo/Keto-Reduktase (aufgrund von Homologie)	2,4	0,003	
<i>IPF16901</i>	orf19.842	unbekannte Funktion	2,0	0,003	
<i>SEO2</i>	orf19.700	Unterdrücker der Sulfoxydethionin Resistenz	2,0	0,005	+
<i>RBT2</i>	orf19.1415	Eisenreduktase (aufgrund von Homologie)	1,9	0,005	
<i>IPF12736</i>	orf19.5673	unbekannte Funktion	2,4	0,006	+
<i>IPF13407</i>	orf19.753	unbekannte Funktion	1,9	0,007	+
<i>PHO87</i>	orf19.2454	Mitglied der Phosphatpermease Familie (aufgrund von Homologie)	1,9	0,01	+
<i>IPF8762</i>	orf19.822	unbekannte Funktion	2,0	0,01	
<i>IPF5496</i>	orf19.2204	unbekannte Funktion	1,9	0,02	+
<i>SSU1</i>	orf19.7313	Sulfit-sensitives Protein (aufgrund von Homologie)	1,9	0,02	
<i>IPF12884</i>	orf19.4779	unbekannte Funktion	1,8	0,02	+
<i>IPF1520</i>	orf19.342	unbekannte Funktion	1,8	0,02	
<i>PGA23</i>	orf19.3740	unbekannte Funktion	2,1	0,02	
<i>IPF8055</i>	orf19.4539	unbekannte Funktion	1,8	0,02	
<i>IPF10795</i>	orf19.2356	putativer Transkriptionsfaktor (aufgrund von Homologie)	1,8	0,02	+
<i>CAN1</i>	orf19.97	Aminosäure Permease (aufgrund von Homologie)	1,7	0,03	+
<i>IPF6624</i>	orf19.6489	unbekannte Funktion	2,0	0,04	
<i>[PHR2</i>	orf19.6081	pH-reguliertes Protein 2	1,5	0,07	+]
<b>Runterreguliert</b>					
<i>ATP2</i>	orf19.5653	F1F0-ATPase-Komplex, F1 $\beta$ -Untereinheit (aufgrund von Homologie)	0,44	1,68E-04	
<i>RBT5</i>	orf19.5636	von <i>TUP1</i> reprimiertes Protein 5	0,45	5,31E-04	+
<i>PHR1</i>	orf19.3829	GPI-verankerte pH-regulierte Glycosyl Transferase	0,22	0,002	+
<i>CHT2</i>	orf19.3895	Chitinase 2 Vorläufer	0,26	0,003	
<i>RPA190</i>	orf19.1839	DNA-gerichtete RNA-Polymerase I (aufgrund von Homologie)	0,52	0,012	
<i>POT11</i>	orf19.7520	peroxisomale 3-Ketoacyl-CoA Thiolase A (aufgrund von Homologie)	0,50	0,012	
<i>PGA36</i>	orf19.5760	unbekannte Funktion	0,41	0,013	
<i>PHO89</i>	orf19.4599	Na <sup>+</sup> -gekoppelter Phosphat	0,30	0,014	+

		Transporter (aufgrund von Homologie)			
<i>ATP1</i>	orf19.6854	F1F0-ATPase Komplex, F1 $\alpha$ -Untereinheit	0,48	0,014	
<i>AGP2</i>	orf19.4679	Aminosäure Permease (aufgrund von Homologie)	0,51	0,014	
<i>PHO84</i>	orf19.1172	inorganisches Phosphat Transportprotein	0,57	0,016	
<i>PGA29</i>	orf19.5305	unbekannte Funktion	0,48	0,016	
<i>FTR1</i>	orf19.7219	Hoch affine Eisenpermease	0,44	0,016	
<i>IPF16479</i>	orf19.2319	unbekannte Funktion	0,52	0,016	+
<i>CFL2</i>	orf19.1264	Eisenreduktase (aufgrund von Homologie)	0,50	0,021	+
<i>NOP58</i>	orf19.1199	Für pre-18S rRNA Prozessierung benötigtes nukleoläres Protein	0,54	0,029	
<i>MPP10</i>	orf19.1915	Komponente des U3 kleinen nukleolären Ribonukleoproteins	0,48	0,030	
<i>ACO1</i>	orf19.6385	Aconitat Hydratase (aufgrund von Homologie)	0,57	0,030	+
<i>SKN1</i>	orf19.7362	Glukan Synthase Untereinheit	0,43	0,030	+
<i>ENA22</i>	orf19.6070	P-Typ ATPase involviert in Na <sup>+</sup> -Efflux (aufgrund von Homologie)	0,47	0,031	+
<i>IPF4386</i>	orf19.1473	unbekannte Funktion	0,46	0,032	
<i>FAS1</i>	orf19.979	Fettsäure-Acyl-CoA Synthase, $\beta$ -Kette	0,58	0,033	
<i>PLB3</i>	orf19.6594	Phospholipase B (aufgrund von Homologie)	0,54	0,033	
<i>PGA24</i>	orf19.3618	putatives Zellwandprotein (aufgrund von Homologie)	0,59	0,033	+
<i>TIF3</i>	orf19.3423	Translations-Initiationsfaktor eIF4B (aufgrund von Homologie)	0,59	0,037	
<i>CIT1</i>	orf19.4393	Citrat Synthase	0,62	0,040	
<i>ZUO1</i>	orf19.2709	Zuotin, putative Z-DNA bindend (aufgrund von Homologie)	0,63	0,041	
<i>EFT3</i>	orf19.4152	Translations-Elongationsfaktor 3	0,49	0,041	
<i>SSB1</i>	orf19.6367	Hitzeschockprotein 70	0,60	0,044	
<i>IPF3584</i>	orf19.3037	Ähnlich zu <i>S.cerevisiae</i> Pab1	0,58	0,045	
<i>PGA7</i>	orf19.5635	Myzeloberflächen-Antigen-Vorläufer	0,61	0,046	

<sup>a</sup>nach CandidaDB; <sup>b</sup> $\Delta dfg16$  im Vergleich zu CAI-4 + Clp10; <sup>c</sup>Student's t-Test; <sup>d</sup>nach (Ramon und Fonzi, 2003); [ ] *PHR2* wurde manuell der Liste hinzugefügt.

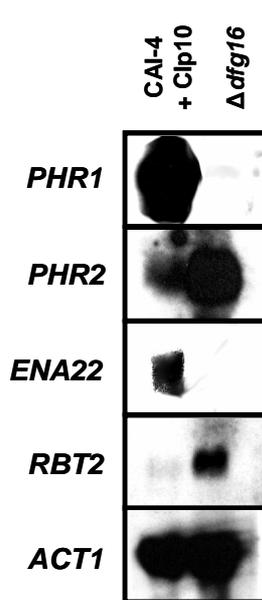
Unter den in der Mutante hochregulierten Genen waren drei Gene (*DDR48*, *RBT2* und *PHO87*) die normalerweise unter alkalischen Bedingungen reprimiert sind (Bensen *et al.*, 2004). Unter den runterregulierten Genen befanden sich einige, deren schwache Expression auch die gefundenen Phänotypen erklären könnten. So war z.B. *FTR1*, welches für eine Eisen-Permease codiert und unter niedrigen Eisenkonzentrationen stark exprimiert wird (Ramanan und Wang, 2000), unter den schwach exprimierten Genen der  $\Delta dfg16$  Mutante. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mutanten, denen *FTR1* fehlt, einen starken Wachstumsdefekt unter Eisen-limitierenden Bedingungen zeigten und eine reduzierte Virulenz in Mäusen aufwiesen (Ramanan und Wang, 2000). Somit ließe sich das verringerte Wachstum der Mutante unter Eisen-limitierenden Bedingungen bei gleichzeitig alkalischem pH-Wert erklären (Abb. 3.43). Im Gegensatz zu *FTR1* wurde *HSP12*, ein Gen welches unter

verschiedenen Stresssituationen inklusive niedriger Eisenkonzentration hochreguliert wird (Lan *et al.*, 2004), auch in der Mutante hochreguliert. Da dieses Gen bei *S. cerevisiae* auch in den Kupfermetabolismus, welcher eng mit dem Eisenmetabolismus verknüpft ist, involviert ist (van Bakel *et al.*, 2005), ist davon auszugehen, dass aufgrund der alkalischen Bedingungen und der gleichzeitig niedrigen Expression von *FTR1* ein extremer Eisen- bzw. auch Kupfermangel in der  $\Delta dfg16$  Mutante vorlag. Die Expression eines weiteren Gens unterstützt diese Hypothese. Auch *RBT2* wird unter niedrigen Eisenkonzentrationen wie z.B. unter dem Einfluss des Eisenchelators Ciclopirox-olamin stark exprimiert (Sigle *et al.*, 2005) und wurde auch in der Mutante hochreguliert (Tab. 3.7 und Abb. 3.48).

Ein weiterer Phänotyp von  $\Delta dfg16$ , das verminderte Wachstum bei alkalischem pH-Wert mit gleichzeitig hoher Kationenkonzentration (Abb. 3.43), könnte auf die verminderte Expression von *ENA22* zurückgeführt werden (Tab. 3.7 und Abb. 3.54). Dieses Gen codiert für eine Na<sup>+</sup>-gekoppelte ATPase, die normalerweise unter alkalischen Bedingungen hochreguliert wird (Bensen *et al.*, 2004). Schließlich könnte die schwache Expression von *PHO89* und *PHO84* den Wachstumsdefekt der Mutante bei niedriger Phosphat-Konzentration (Abb. 3.43) erklären.

Der deutlichste Hinweis auf eine Dysregulation der pH-abhängigen Gene ergab sich jedoch aus der Expression von *PHR1* und *PHR2*. *PHR1* wird normalerweise unter alkalischen Bedingungen exprimiert und unter sauren Bedingungen reprimiert (Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Für *PHR2* ergibt sich das gegenteilige Bild (Muhlschlegel und Fonzi, 1997). Das Transkriptionsprofil und der zur Bestätigung durchgeführte Northern-Blot zeigten in der  $\Delta dfg16$  Mutante jedoch ein umgekehrtes Bild: unter den getesteten alkalischen Bedingungen war *PHR1* in der Mutante reprimiert wohingegen *PHR2* eine starke Expression in der Mutante als in CAI-4 + Clp10 aufwies (Tab. 3.7 und Abb. 3.48).

Diese Ergebnisse zeigten, dass  $\Delta dfg16$  nicht in der Lage ist den pH-Wert des umgebenen Mediums korrekt zu erkennen.

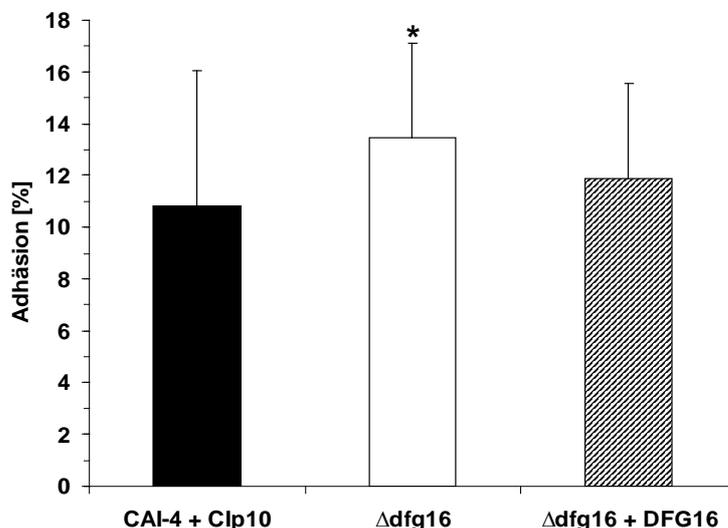


**Abb. 3.48:** Northern-Blot zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse aus Tabelle 3.7. Deutlich zu erkennen ist die Dysregulation von *PHR1* und *PHR2* in der  $\Delta dfg16$  Mutante. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde *ACT1* gewählt.

### 3.6.2.8 Interaktion von $\Delta dfg16$ mit humanen Zellen

Neben den ersten Untersuchungen, die das Verhalten der Mutante unter verschiedenen einfachen, definierten Bedingungen zeigten, wurden auch komplexere Interaktionen mit humanen Zellen analysiert. Dazu zählten das Adhäsionsverhalten der Mutante und die Eigenschaft, von humanen Zellen endocytiert zu werden.

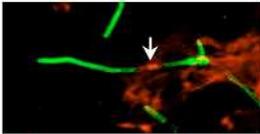
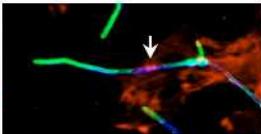
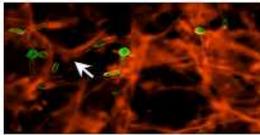
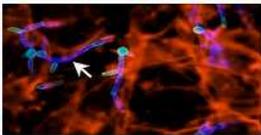
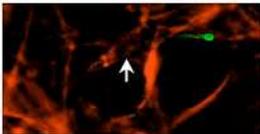
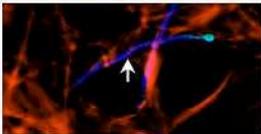
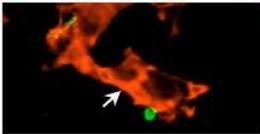
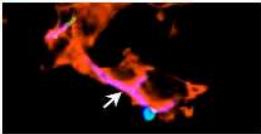
Die Adhäsion der  $\Delta dfg16$  Mutante und der Retransformante wurde auf einem HEp-2 Monolayer untersucht und zeigte, dass die  $\Delta dfg16$  Mutante im Vergleich zur Kontrolle eine leicht erhöhte Adhäsion an die humanen Zellen aufwies (Abb. 3.49). Die Retransformante zeigte keinen Unterschied in der Adhäsion an HEp-2 Zellen im Vergleich zu CAI-4 + Clp10.



**Abb. 3.49:** Adhäsionsassay an HEp-2 Zellen. Nach der Inkubation wurden nicht adhärenente Zellen gewaschen und die adhärenente *Candida*-Zellen wurden nach Lyse der Hep-2 Zellen mittels cfu-Zählung bestimmt. \* = signifikanter Unterschied zu CAI-4 + Clp10 mit  $P < 0,05$ .

Als nächstes wurde die Interaktion der Mutante mit 3T3-Fibroblasten analysiert. Dabei wurde vor allem die Morphologie der  $\Delta dfg16$  Mutante und die Menge an endocytierten/invasiven Zellen bestimmt. Die Endocytose-/ Invasionsrate wurde mit Hilfe eines differentiellen Anfärbens der *Candida*-Zellen nach Inkubation mit den Fibroblasten untersucht (Jacquinot *et al.*, 1998). Dazu wurden die Teile der Pilzzellen, die sich außerhalb der Fibroblasten befanden mit einem fluoreszenzgekoppeltem Antikörper gefärbt. Nach der Permeabilisation der Fibroblasten-Membran wurde anschließend die gesamte Pilzzelle mit Calcofluor gegengefärbt. Durch Überlagerung der beiden so gewonnenen Bilder konnten die Teile identifiziert werden, die von den Fibroblasten endocytiert worden waren bzw. invasiv waren. Die Anzahl der endocytierten/invasiven *Candida*-Zellen konnte so bestimmt werden. Neben dem Wildtyp und der Retransformante wurde bei diesem Versuch auch wieder die  $\Delta rim101$  Mutante als zusätzliche Kontrolle analysiert (vgl. Abb. 3.45).

Abbildung 3.50 gibt die Ergebnisse des Endocytose-/Invasions-Assays wider. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind die Hyphen der beiden Mutanten deutlich kürzer als die von CAI-4 + Clp10 oder der Retransformante. Dies bestätigte die Ergebnisse der Hyphenlängenmessung (Abb. 3.45), wonach Kontakt zu hydrophoben Oberflächen bzw. Zellen den Defekt in der pH-induzierten Hyphenbildung nur teilweise aufheben kann.

	Alexa-fluor 568	Alexafluor 568 + Calcofluor	endocytierte/ invasive Zellen [%]
CAI-4+Clp10			40 ± 5.7
$\Delta dfg16$			42 ± 2.8
$\Delta dfg16 + DFG16$			34 ± 8.5
$\Delta rim101$			44 ± 5.7

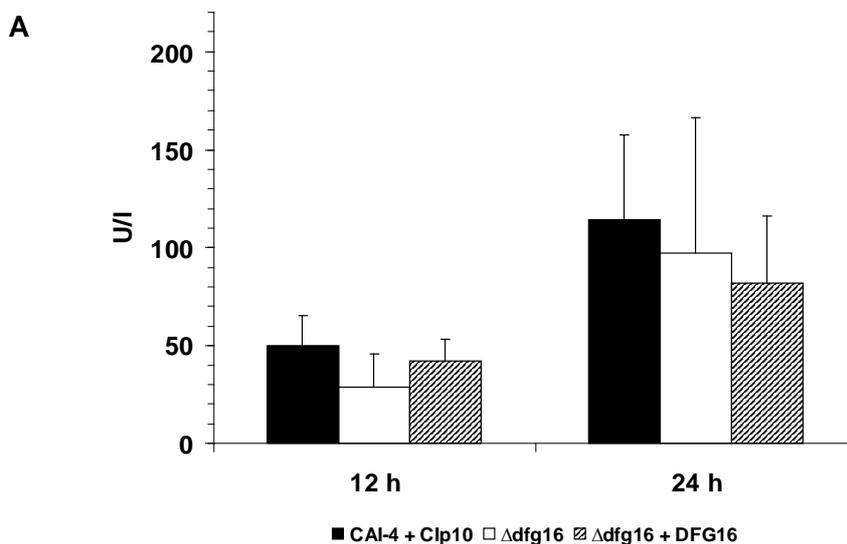
**Abb. 3.50:** Endocytose-/Invasions-Assay. Die *Candida*-Zellen wurden differentiell mit Alexafluor 568 (grün) bzw. nach Permeabilisierung mit Calcofluor (blau) angefärbt und endocytierte Zellen, die nur durch Calcofluor angefärbt werden konnten, wurden gezählt. Zur besseren Betrachtung der Fibroblasten wurde das Actin der Zellen mit Phalloidin (rot) gefärbt. Die Pfeile markieren endocytierte bzw. invasive *Candida*-Zellen.

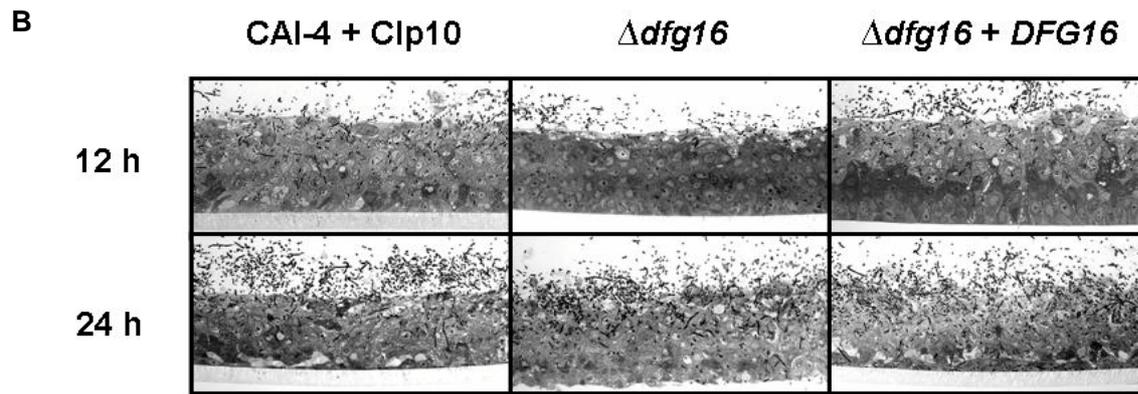
Der obigen Abbildung ist weiterhin zu entnehmen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Endocytose- bzw. Invasionsrate zwischen den einzelnen Stämmen gab. Somit ist davon auszugehen, dass eine Mutation im Rim101-Signaltransduktionsweg keinen Einfluss auf das Verhalten von Wirtszellen hat.

### 3.6.2.9 Orale und systemische Infektion mit $\Delta dfg16$

Als letzter Schritt der Analyse der  $\Delta dfg16$  Mutante wurde das Verhalten von  $\Delta dfg16$  in einem oralen *in vitro* Infektionsmodell und während einer systemischen Infektion untersucht.

Für das orale Infektionsmodell wurde das unter 3.1.7 beschriebene rekonstituierte humane Epithel (RHE) verwendet. Es wurde neben der Messung der Lactat-Dehydrogenase-Konzentration im Medium auch das histologische Bild der Infektion analysiert.





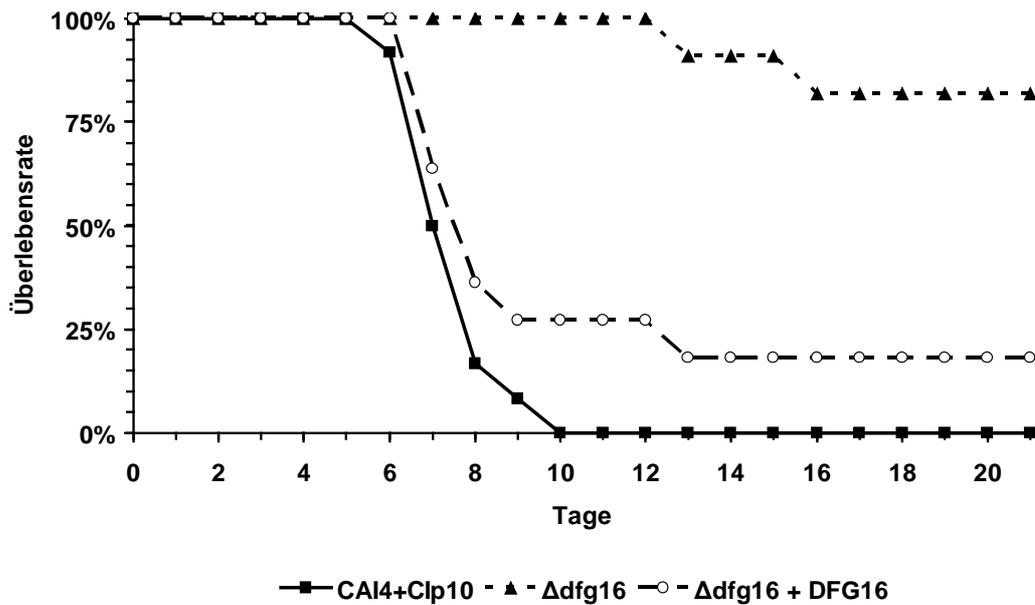
**Abb. 3.51: (A)** LDH-Freisetzung nach RHE-Infektion. **(B)** Histologie der RHE-Infektion. Nach 24 h waren bei allen drei Stämmen die Epithelzellen stark geschädigt und Hyphen hatten tiefere Schichten des RHE erreicht.

Die Freisetzung von LDH in das Kulturmedium zeigte nur eine leichte, nicht signifikante Verminderung bei der  $\Delta dfg16$  Mutante nach 12 h Inkubation. Nach 24 h hatten sich alle Werte mehr oder weniger angeglichen (Abb. 3.51 A).

Auch das histologische Bild zeigte nur einen Unterschied zwischen der Mutante und den Kontrollen 12 h nach Beginn der Inkubation (Abb. 3.51 B). Es wurden kaum Hyphen beobachtet, die bereits in das RHE eingedrungen waren. Nach 24 h aber zeigten die Epithelzellen eine deutliche Schädigung und bei allen drei Stämmen waren Hyphen auch in den tieferen Schichten des RHE zu erkennen (Abb. 3.51 B).

Sowohl die Konzentration an freigesetztem LDH als auch die Histologie waren mit den Ergebnissen der Infektion mit SC5314 bzw. ATCC10231 zu vergleichen (siehe Abb. 3.11). Somit ist davon auszugehen, dass *DFG16* nur eine geringe Rolle bei der oralen *in vitro* Infektion spielt.

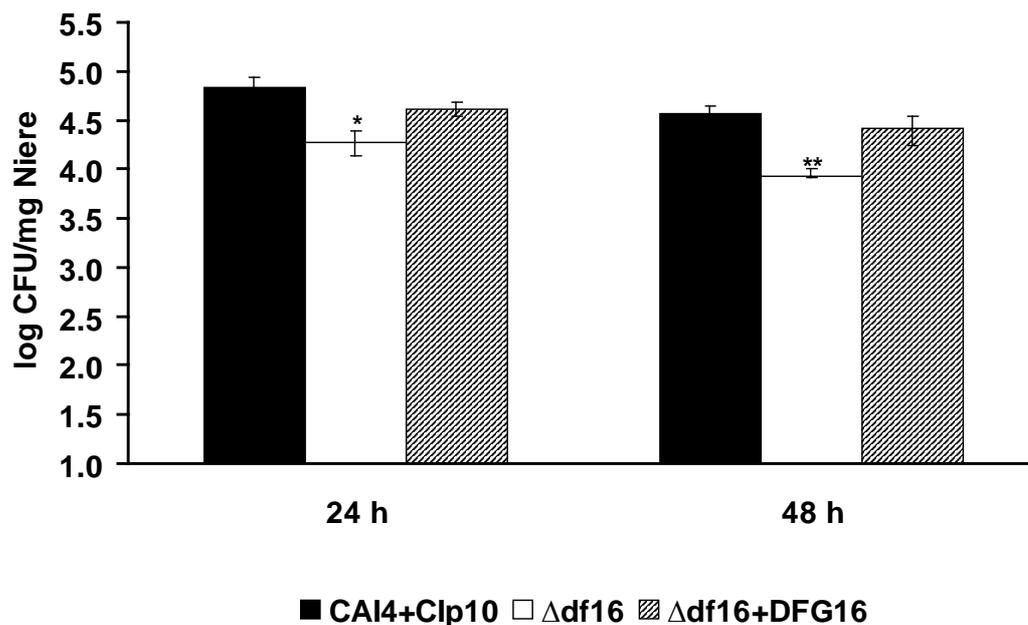
Als nächstes wurde die  $\Delta dfg16$  Mutante in Zusammenarbeit mit Hyunsook Park und Scott Filler vom UCLA Medical Center, Los Angeles, USA, im intravenösen Mausmodell, welches eine systemische Infektion darstellt, getestet. Dazu wurden Balb/C-Mäuse über die Schwanzvene mit *C. albicans* infiziert und die Überlebensrate wurde über 21 Tage verfolgt. Zusätzlich wurden zwei Gruppen von Tieren nach 24 h bzw. 48 h die Nieren und die Leber entnommen und die Anzahl der *Candida*-Zellen in den Organen wurde über die cfu bestimmt.



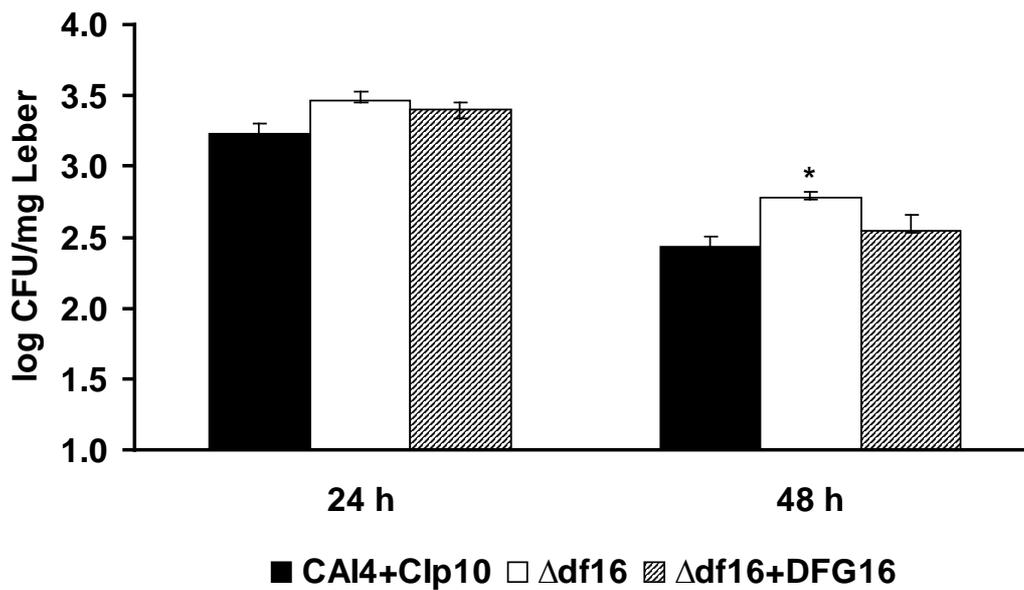
**Abb. 3.52:** Überlebensrate von Balb/C-Mäusen nach i.v. Infektion mit der  $\Delta dfg16$  Mutante, der Retransformante und CAI-4 + Clp10. Es wurden pro Stamm 11-12 Mäuse infiziert und über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet.

Wie in der Abbildung 3.52 zu erkennen ist, waren nach 10 Tagen alle Mäuse, die mit CAI-4 + Clp10 infiziert waren, verstorben. Im Gegensatz dazu waren selbst nach 21 Tagen über 80 % der Mäuse, die mit  $\Delta dfg16$  infiziert waren, noch am leben. Die Überlebensrate der Mäuse, die mit der Retransformante infiziert waren, lag bei nur ca. 20 %.

A



B



**Abb. 3.53:** (A) Anzahl der cfu in der Niere 24 h bzw. 48 h nach der Infektion. Die Organbelastung nimmt bei allen drei Stämmen im zeitlichen Verlauf ab aber nur die  $\Delta df16$  Mutante zeigt eine signifikant niedrigere Belastung im Vergleich zu CAI-4 + Clp10. (B) Anzahl der cfu in der Leber 24 h bzw. 48 h nach der Infektion. Nur 48 h nach der Infektion zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Mutante und den beiden Kontrollen. \* = signifikant im Vergleich zum Wildtyp und zur Retransformante mit  $P < 0,05$ ; \*\* = signifikant im Vergleich zur Retransformante mit  $P < 0,05$ .

Diese Ergebnisse spiegelten sich zum Teil auch in der Organbelastung der Mäuse mit *Candida*-Zellen wider. So war die Anzahl der Pilzzellen in der Niere bei der Mutante sowohl nach 24 h als auch nach 48 h signifikant niedriger als bei der Retransformante und der Wildtyp-Kontrolle (Abb. 3.53 A). In der Leber hingegen zeigten sich nach 24 h kein Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle und Retransformante, nach 48 h war aber die Anzahl der Pilzzellen in der Leber gegenüber dem Wildtyp und der Retransformante signifikant erhöht (Abb. 3.53 B). Die beiden in Abbildung 3.52 und 3.53 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass *DFG16* essentiell für eine systemische Infektion in der Maus ist und dass eine Mutation in diesem Gen den *C. albicans* Stamm stark attenuiert.

