

4. Diskussion

4.1 Interaktion von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe (RHE)

Der fakultativ humanpathogene Pilz *C. albicans* stellt einen Bestandteil der oralen Mikroflora des Menschen dar. Prädisponierende Faktoren für eine Infektion durch *C. albicans* sind unter anderem ein geschwächtes Immunsystem oder Störungen der lokalen Mikroflora. Bei intaktem Immunsystem und einer gesunden mikrobiellen Flora beschränkt sich die Interaktion auf eine Besiedelung der epithelialen Strukturen (Kolonisierung). Die Pilzzellen können dabei durch die normale Mikroflora kontrolliert und eine Ausbreitung verhindert werden. So konnte gezeigt werden, dass z.B. *Pseudomonas aeruginosa* das Wachstum von *C. albicans* in der Mundhöhle inhibiert (Hogan and Kolter, 2002; Kerr *et al.*, 1999). Weiterhin wird die epitheliale Kolonisierung durch unspezifische epitheliale Abwehrmechanismen oder spezifische Komponenten des Immunsystems kontrolliert. Auch für bestimmte Abwehrmechanismen der Wirtszellen konnte eine direkte Beeinflussung des Wachstums oder der morphologischen Entwicklung von *C. albicans* gezeigt werden (Leigh *et al.*, 2006; Steele *et al.*, 2000) (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.5: Epithelgewebe und mukosale Immunität). Orale Infektionen durch *C. albicans* manifestieren sich durch eine massenhafte Vermehrung der Pilzzellen sowie einer Invasion der Pilzzellen in oberflächennahe Bereiche des Epithelgewebes (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.3: Klinik von *C. albicans* Infektionen). Die zellulären und molekularen Mechanismen der Interaktion von *C. albicans* während der Kolonisierung oder der Infektion des oralen Epithelgewebes sind dabei noch weitgehend unklar. Um die komplexen Vorgänge der Wirt-Pathogen Interaktionen während der Infektion zu untersuchen, wurde eine experimentelle Infektion durchgeführt und analysiert. Dazu wurde ein *in vitro* generiertes orales Epithelgewebe (RHE) mit *C. albicans* infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert.

4.1.1 Initiation der experimentellen Infektion: Hyphenbildung und Adhärenz

Die frühe Phase (1 h) der experimentellen Infektion des oralen Epithelgewebes (RHE) war gekennzeichnet durch die unmittelbare Induktion der Hyphenbildung in den *C. albicans* Zellen. Diese unmittelbare Induktion der Hyphenbildung lässt sich möglicherweise auf den Kontakt zu den oralen Epithelzellen zurückführen, da der physikalische Kontakt zu Oberflächen im Allgemeinen und zu epithelialen Zelloberflächen im Speziellen einen Stimulus für den Hefe/Myzel Übergang in *C. albicans* Zellen darstellt (Sudbery *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 1999). Die beobachtete Hyphenbildung steht auch in Einklang mit bereits beschriebenen virulenzassoziierten Phänomenen, da für *C. albicans* die elongierte Myzelform als die für die Virulenz bedeutende Morphologie diskutiert wird. Dies basiert auf verschiedenen Studien, in denen Mutantenstämme mit defekter Myzelbildung sehr oft avirulent in verschiedenen Infektionsmodellen waren (Park *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2004; Tsuchimori *et al.*, 2000). Auch bei vielen anderen humanpathogenen Pilzen spielt die Änderung der Morphologie bei der Pathogenese eine wichtige Rolle. So bildet sich z. B. aus den inhalierten Sporen der humanpathogenen Pilze *Histoplasma capsulatum* oder *Paracoccidioides brasiliensis* in den Lungen des Wirtes die pathogene Hefeform (Woods, 2003; Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Aus den Sporen von *Aspergillus* ssp. bilden sich filamentöse Hyphenzellen bei Kontakt zu epithelalem Lungengewebe (Brakhage, 2005). Den ausschlaggebenden Stimulus für einen morphologischen Wechsel stellt bei diesen Pilzen neben der Körpertemperatur des Menschen auch der Kontakt zu Wirtsgewebe dar (Nemecek *et al.*, 2006).

In Korrelation mit der Hyphenbildung der *C. albicans* Zellen konnte eine starke Adhäsion an das orale Epithelgewebe beobachtet werden. Dies steht in Einklang mit verschiedenen Studien, in denen die Hyphenmorphologie im Vergleich zu der Hefemorphologie als die adhärentere Form in *C. albicans* beschrieben wurde (Sundstrom, 2002; San-Blas *et al.*, 2000; Sundstrom, 1999). Eine neuere, vergleichende Studie, welche die Adhärenz von *C. albicans* an Endothel-, vaginale Epithelzellen und Plastikoberflächen untersuchte, zeigte ebenfalls, dass nur die Pilzzellen, bei denen Hyphenbildung stattgefunden hatte, auch fest an die jeweilige Oberfläche adhärirt waren (Sohn *et al.*, 2006). Die in der vorliegenden

Arbeit untersuchte Adhärenz der *C. albicans* Zellen an verschiedene Epithelzellen war interessanterweise abhängig von der Temperatur. Bei 37°C Inkubationstemperatur zeigten die *C. albicans* Zellen eine quantitativ stärkere Adhäsion als bei 30°C. Die Körpertemperatur des Menschen (37°C) stellt einen begünstigenden Faktor für das Hyphenwachstum in *C. albicans* dar, ein Wachstum bei 30°C begünstigt hingegen das Wachstum in der Hefeform (Sudbery *et al.*, 2004). Der physikalische Kontakt zu den Epithelzellen, kombiniert mit einer Umgebungstemperatur von 37°C, könnte somit synergistisch wirken. Dies könnte bei quantitativ mehr Zellen zu einer Induktion der Hyphenbildung führen und eine stärkere Adhärenz der *C. albicans* Zellen an die Epithelzellen bewirken.

Auf molekularer Ebene sind an den adhäsiven Fähigkeiten bakterieller und fungaler Zellen unter anderem adhäsions-vermittelnde Proteine, so genannte Adhäsine, beteiligt. *C. albicans* besitzt einige für Adhäsine kodierende Gene (z.B. Hwp1p, Als1p und Eap1p), deren Deletion sich in verschiedenen Studien negativ auf das Adhäsionsverhalten von *C. albicans* auswirkte (Li and Palecek, 2003; Hoyer, 2001). Interessanterweise ist die Expression einiger Adhäsine in *C. albicans* direkt oder indirekt mit dem Hyphenwachstum korreliert (Kumamoto and Vines, 2005b). So konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene für die Adhäsine *Hwp1*, *Als1* oder *Als3* von Efg1p, einem Schlüsselregulator des Hyphenwachstums, in *C. albicans* abhängig ist. Zudem konnte die Expression des in *C. albicans* sehr wichtigen Adhäsins, Hwp1p bisher nur in Hyphenzellen (Wildtyp) nachgewiesen werden (Staab *et al.*, 1999a), was die Wichtigkeit der Hyphenmorphologie für die Adhäsionseigenschaften weiterhin untermauert.

Infektionsbiologisch stellt die Kolonisierung eines Gewebes in den meisten Fällen den ersten Schritt einer Infektion dar. Für weiterführende Wechselwirkungen wie zum Beispiel der Invasion in die Gewebestrukturen, ist die Adhäsion bakterieller, parasitärer, viraler oder fungaler Erreger eine wichtige Voraussetzung (Guglielmi *et al.*, 2006; Pizarro-Cerda and Cossart, 2006; Mendes-Giannini *et al.*, 2005). Interessanterweise wurden durch die *C. albicans* Zellen auch auf der epithelialen Wirtsseite Strukturen induziert, welche an der Adhärenz der Pilzzellen an die Epithelzellen beteiligt sein könnten. Die mikroskopische Analyse der frühen Interaktion der Hyphenzellen mit dem epithelialen Gewebe zeigte deutlich elongierte Pseudopodien und Zellfortsätze der Epithelzellen welche auf die Hyphenzellen zuwuchsen bzw. diese umschlossen. Weiterhin konnten gekräuselte

Membranstrukturen (*membrane ruffling*) beobachtet werden, die an einer Inkorporierung der Hyphenzellen beteiligt waren (induzierte Endozytose). Ähnliche Mechanismen konnten auch bei der Interaktion invasiver Bakterien mit verschiedenen Geweben (Cossart and Sansonetti, 2004) oder bei der Interaktion von *C. albicans* mit Endothel- und Epithelzellen beobachtet werden (Park *et al.*, 2005; Filler *et al.*, 1995). Dabei führten die durch die pathogenen Mikroorganismen induzierten strukturellen Änderungen der Gewebeoberflächen zu einer, seitens der Mikroorganismen, passiven Aufnahme. Die für *C. albicans* beobachteten Mechanismen der Interaktion mit den Epithelzellen konnten für den apathogenen und monomorphen Modellorganismus *S. cerevisiae* nicht beobachtet werden. Auch die Adhärenz der *S. cerevisiae* Zellen an die oralen Epithelzellen stellte sich als signifikant geringer dar. Ebenso konnte keine Änderung der epithelialen Oberfläche (Pseudopodien oder *membrane ruffling*) beobachtet werden. Dies impliziert, dass die Adhärenz sowie die beobachtete induzierte Endozytose der *C. albicans* Zellen auf deren Hyphenbildung zurückzuführen ist und diese einen sehr wichtigen Aspekt in der frühen Phase der Infektion darstellt.

4.1.2 Späte Phase der experimentellen Infektion: Invasion und Gewebeschädigung

Die mikroskopische Analyse der mittleren und späten Zeitpunkte der experimentellen RHE-Infektion war gekennzeichnet durch eine starke Myzelbildung und invasives Wachstum der *C. albicans* Zellen. Die Oberfläche des epithelialen Gewebes war zu den späten Zeitpunkten (>12 h) vollständig mit einem dichten Myzelgeflecht bedeckt, und histologische Schnitte zeigten tief in das Gewebe eingedrungene Hyphenzellen. Korreliert waren die mittleren und späten Zeitpunkte der Interaktion mit einer starken Gewebeschädigung, quantifiziert durch den Nachweis extrazellulärer Aktivität der epithelialen Laktat-Dehydrogenase. Während der frühen Zeitpunkte der Gewebeinteraktion konnte hingegen kaum Gewebeschädigung nachgewiesen werden. Neben der induzierten Endozytose der frühen Zeitpunkte konnte in den späten Zeitpunkten der Interaktion auch eine aktive Penetration der *C. albicans* Hyphenzellen beobachtet werden. Eine Korrelation zwischen invasivem Wachstum und der elongierten Hyphenform konnte für *C. albicans* bereits in verschiedenen Studien *in vitro* gezeigt werden

(Gow *et al.*, 2002). Dabei zeigten sich das apikale Wachstum sowie der Turgordruck der Hyphenzellen als die entscheidenden Kriterien für das invasive Wachstum und eine aktive Penetration (Bastmeyer *et al.*, 2002). Die Elongation der Hyphen in *C. albicans* findet generell über die apikale Ausdehnung der Spitze statt, so dass an dieser ein bestimmter Druck aufgebaut werden kann, welcher sich *in vitro* als ausreichend für eine Penetration in 8%igen Agar zeigte (Money, 2001). Eine unterstützende Rolle bei der aktiven Penetration der Hyphenzellen in Wirtsgewebe wird zudem für die sekretierten hydrolytischen Enzyme wie z.B. die sekretorischen Asparatproteasen (Saps), die Lipasen (Lips) oder die Phospholipasen (Pls) diskutiert, da diese möglicherweise an der Lyse von Wirtsstrukturen beteiligt sind (Schaller *et al.*, 2005).

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der späten Phase der experimentellen RHE Infektion zeigen Hyphenzellen die sowohl in das Gewebe penetrierten, als auch solche die entlang der Oberfläche wuchsen. Die selektive Penetration der epithelialen Oberfläche könnte dabei auf Phänomen des Thigmotropismus zurückzuführen sein, der Fähigkeit Oberflächenänderungen zu erkennen und auf diese zu reagieren. Für *C. albicans* Hyphenzellen konnte bereits in verschiedenen Studien Thigmotropismus *in vitro*, bei der Interaktion mit abiotischen Oberflächen (Brown *et al.*, 1999; Sherwood *et al.*, 1992) oder bei der Interaktion mit eukaryotischen Zellen (Wiesner *et al.*, 2002; Reichart *et al.*, 1995) gezeigt werden. Dabei wuchsen die elongierten *C. albicans* Hyphen entlang von Membranen oder zellulären Oberflächen und penetrierten in Löcher der Membranen oder in strukturelle Unebenheiten der zellulären Oberflächen, sobald physischer Kontakt bestand. Inwieweit Thigmotropismus bei der Penetration des oralen Epithelgewebes eine Rolle spielt, kann anhand der mikroskopischen Analysen der experimentellen Infektion nicht abschließend geklärt werden. Basierend auf den mikroskopischen Analysen der Interaktionen liegt die Vermutung jedoch nah, dass strukturelle Unebenheiten der Gewebe- und Zelloberflächen die aktive Penetration der Hyphenzellen erleichtern oder sogar induzieren. Auch für eine Reihe anderer pflanzen- und humanpathogener Pilze wurde das Phänomen des Thigmotropismus bereits beschrieben (Davies *et al.*, 1999). So zeigen z.B. die pflanzenpathogenen Pilze *Uromyces appendiculatus*, *Puccinia hordei* und *Magnaporthe grisea* thigmotropisches Wachstum auf den Blattoberflächen, was ihnen ein invasives Wachstum in Spaltöffnungen oder

Verletzungen ermöglicht und damit eine Infektion des Pflanzengewebes erleichtert (Read *et al.*, 1997; Xiau *et al.*, 1994; Hoch *et al.*, 1987). Der Faktor des positiven chemotropen Wachstums als treibende Kraft für das invasive Wachstum in das orale Epithelgewebe ist indess für *C. albicans* weniger wahrscheinlich. In dieser Arbeit durchgeführte Kontrollexperimente zeigten Penetration und invasives Wachstum der *C. albicans* Hyphenzellen, unabhängig von umgebenden nährstoffarmen oder nährstoffreichen Medien.

Verbunden mit der Elongation der Hyphenzellen und der aktiven Penetration der Hyphen in die epithelialen Gewebestrukturen konnte eine Ausbreitung des Myzels innerhalb des Gewebes beobachtet werden. Diese Interaktion zu den späten Zeitpunkten der experimentellen Infektion war korreliert mit einem hohen Maß an Gewebeerstörung. Die Hyphenzellen waren dabei vereinzelt in membranartigen Strukturen eingebettet. Die Untersuchung dieser „Tunnelstrukturen“ zeigte eine Beteiligung des Strukturproteins Aktin, einer Komponente des Zytoskelettes. Möglicherweise sind diese Strukturen innerhalb des Gewebes auf Invaginationen der Epithelzellen zurückzuführen. Die Invaginationen wiederum könnten durch die beobachtete induzierte Endozytose der Hyphen eingeleitet worden sein. Park *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass an der induzierten Endozytose der *C. albicans* Hyphenzellen Aktinkomponenten der Wirtszelle beteiligt sind. Die induzierte Endozytose ließ sich dabei durch die Verwendung von Cytochalasin D, einem potenten Inhibitor des Aktinzytoskeletts, signifikant inhibieren (Park *et al.*, 2005). Weiterhin könnten auch strukturelle Eigenschaften der Gewebe einen Einfluss auf die Penetration der Pilzzellen haben, wie z.B. die Verhornung eines Epithels. Bereits sehr frühe Arbeiten zu Interaktionen von *C. albicans* mit verschiedenen Geweben zeigten, dass *C. albicans* Hyphenzellen durch Gewebe penetrieren können, ohne dabei signifikante Gewebeschädigungen hervorzurufen (Scherwitz, 1982; Howlett and Squier, 1980). Bei den in diesen Arbeiten verwendeten Biopsien handelte es sich um Gewebe aus verschiedenen Kleinsäugetern (Maus, Ratte und Kaninchen). Dabei ist z.B. die orale Mukosa von Mäusen durch eine deutlich stärkere Verhornung charakterisiert als die orale Mukosa des Menschen (M. Kretschmar, persönliche Mitteilung). Diese stärkere Verhornung der apikalen Epithelschichten könnte somit möglicherweise einen stärkeren Schutz gegen die aktive Penetration der *C. albicans* Hyphenzellen bedeuten. Basierend auf diesen strukturellen Eigenschaften des Gewebes könnte es infolgedessen, je nach

Gewebeart, entweder zu einer vermehrten aktiven Penetration der Pilzzellen (korreliert mit Gewebeerstörung) oder zu einer vermehrten induzierten Endozytose kommen.

Mit Wirtszellen und -gewebe zu interagieren und in diese internalisiert zu werden, stellt ein weit verbreitetes Prinzip pathogener Mikroorganismen dar. Auch an der Aufnahme von *Aspergillus fumigatus* in Endothelzellen spielen strukturelle Änderungen der Zelloberfläche eine wichtige Rolle (Lopes Bezerra and Filler, 2004). Ebenso konnte bei der Internalisierung der humanpathogenen Pilze *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* oder *Cryptococcus neoformans* strukturelle Änderungen der Oberfläche der Wirtszellen beobachtet werden (Mendes-Giannini *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003; Scott and Woods, 2000). Für die sogenannten invasiven Bakterien sind die molekularen Mechanismen der Internalisation deutlich detaillierter untersucht als für die meisten pathogenen Pilze. Die Mechanismen, z.B. *Zipper* (*Yersinia*, *Listeria*) oder *Trigger* (*Salmonella*, *Shigella*) basieren dabei auf der gezielten Induktion struktureller Änderungen der Wirtszelloberfläche, welche zur Internalisierung der Mikroorganismen führen (Pizarro-Cerda and Cossart, 2006; Cossart and Sansonetti, 2004). Nach der Aufnahme in die Wirtszellen verbleiben die Bakterien meist in Vakuolen, um sich dort zu replizieren (*Salmonella*) oder nutzen Zytoskelettkomponenten des Wirtes (*actin recruitment*), um sich in oder aus der Zelle fortzubewegen (*Listeria*, *Shigella*) (Cossart and Sansonetti, 2004). Die weiterführenden Interaktionen mit dem Wirtsgewebe unterscheiden sich bei *C. albicans* in dieser Hinsicht grundlegend von denen der invasiven Bakterien. Aufgrund des dimorphen Charakters besteht für *C. albicans* neben der für die Pilzzellen passiven Interaktion (induzierte Endozytose) auch die bereits beschriebene Möglichkeit der aktiven Penetration. Die elongierten Hyphenzellen können das Gewebe aktiv penetrieren, sich invasiv ausbreiten und die Wirtszellen auch wieder verlassen. Diese Eigenschaft von *C. albicans* spielt z.B. bei der Interaktion mit Makrophagen eine wichtige Rolle. Lorenz *et al.* konnten zeigen, dass *C. albicans* Hefenzellen durch murine Makrophagen phagozytiert werden (Lorenz *et al.*, 2004). Durch die Induktion des Hyphenwachstums konnten die Zellen jedoch wieder aus den Makrophagen penetrieren und einer Abtötung somit entgehen (Lorenz *et al.*, 2004).

Basierend auf der mikroskopischen Analyse der Interaktion des oralen Epithelgewebes mit den *C. albicans* Zellen, erfolgte die Unterteilung der

experimentellen oralen Infektion in verschiedene Phasen. Die frühe Phase der Interaktion (1 h) war charakterisiert durch eine unmittelbare Induktion der Hyphenmorphologie der *C. albicans* Zellen, die späte Phase (>12 h) durch ein invasives Ausbreiten der Hyphenzellen im Epithelgewebe. Diese späte Phase der Interaktion könnte möglicherweise mit der Manifestation einer oralen Infektion *in vivo* verglichen werden, wie es z.B. in HIV⁺ Patienten mit einer oralen Candidose der Fall ist. Während einer oralen Infektion *in vivo* interagieren die *C. albicans* Zellen ebenfalls durch invasives Wachstum mit dem Epithelgewebe und werden dabei nicht durch die zelluläre Abwehr, die lokale Mikroflora oder Komponenten des Immunsystems in Schach gehalten (Fidel, 2006). Aufgrund der fehlenden Mikroflora, des fehlenden Speichels sowie der fehlenden Komponenten des Immunsystems konnten sich die *C. albicans* Zellen auch bei der Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe (RHE) *in vitro* ungehindert ausbreiten. Die genannten Komponenten (z.B. die bakterielle Mikroflora oder Komponenten des Immunsystems) spielen bei der Kolonisierung epithelialer Strukturen durch *C. albicans* als Kommensale eine wichtige, regulierende Rolle, da sie eine massenhafte Vermehrung der Pilzzellen verhindern und für eine ausgeglichene orale Mikroflora sorgen. Die Untersuchung der frühen Phasen bietet hingegen die Möglichkeit, weitestgehend „steril“ die Initiation einer oralen Infektion auf zellulärer Ebene zu analysieren, so wie es *in vivo*, aufgrund der Heterogenität der Zellpopulationen oder des Einflusses der verschiedenen Komponenten (Mikroflora etc.) möglicherweise nur schwer zu beobachten ist.

4.2 Mikroarray basierte Analyse der Interaktionen von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe *in vitro* und *in vivo*

4.2.1 Mikroarrayanalysen *in vitro* und *in vivo*

Mikroarray basierte Transkriptomuntersuchungen ermöglichen es, einen weitreichenden Überblick über die stattfindenden Expressionsvorgänge zu erhalten sowie gezielt spezielle Vorgänge oder Interaktionen zu untersuchen (Bryant *et al.*, 2004). In verschiedenen Mikroarray-Studien wurden die Interaktion

mit Wirtsgewebe, die Virulenz oder das Überleben verschiedener bakterieller, viraler, parasitärer oder fungaler Organismen ebenso untersucht wie die Reaktionen der Wirtsgewebe (Mans *et al.*, 2006; Okomo-Adhiambo *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2004; Grifantini *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Aufgrund einer Vielzahl technischer Herausforderungen, wie z.B. geringe Mengen des Probenmaterials, wurden bis heute aber nur sehr wenige Mikroarraystudien mit *in vivo* isoliertem Probenmaterial (z.B. Patientenproben) durchgeführt (Roos and Klemm, 2006; Sebbane *et al.*, 2006). Ein weiteres Problem bei der Untersuchung von infizierten Gewebeproben (*in vitro* oder *in vivo*) stellt oft die Heterogenität des Probenmaterials dar. Dieses Problem ergibt sich z.B. auch bei der Untersuchung von oberflächlichen (mukosalen) *C. albicans* Infektionen, bei denen ein Teil der Pilzzellen an der Oberfläche des Gewebes lokalisiert ist und ein anderer Teil der Zellen invasives Wachstum und eine enge Assoziation mit dem Wirtsgewebe zeigt. Die Heterogenität der Zellpopulationen erschwert die Interpretation der erstellten Transkriptionsprofile, da bestimmte Gene in den verschiedenen Zellpopulationen möglicherweise unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Neben möglichen Populationsunterschieden spielen bei den *in vivo* isolierten Patientenproben multiple äußere Einflüsse (z.B. Speichelfluss, Mikroflora) sowie Komponenten des Immunsystems oder individuelle Eigenschaften der einzelnen Patienten (z.B. Alter, spezifische Erkrankungen) eine wichtige Rolle. Diese Komponenten können die Interaktion der einzelnen Pilzzellen mit dem Epithelgewebe oder den Verlauf der Infektion beeinflussen und begründen somit eine individuelle Varianz der einzelnen Patientenproben. Diese biologische Varianz der Proben stellt ebenfalls eine Herausforderung bei der Analyse der Daten dar, da vor allem die *in vivo* Proben den strengen mathematischen Parametern der statistischen Signifikanz oft nicht entsprechen können und viele der gewonnenen Expressionsdaten somit nicht oder nur unvollständig verwertet werden könnten. Dementsprechend ist bei der Interpretation der Transkriptionsprofile zu berücksichtigen, dass diese möglicherweise ein nicht ganz vollständiges Bild der molekularen Gewebeinteraktion widerspiegeln, da für einige Gene auf Grund der Populationsunterschiede (z.B. Hefen und Hyphen) innerhalb der Probe sowie der biologischen Schwankungen per se keine statistisch relevanten Daten erzielt werden konnten.

4.2.2 Analyse des Transkriptionsprofils der experimentellen RHE Infektion: Interaktionen von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe *in vitro*

4.2.2.1 Phasenspezifische Anpassung an das orale Epithelgewebe

Das *in vitro* erstellte Transkriptionsprofil spiegelt auf molekularer Ebene vor allem die adaptive Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe wider. Eine Änderung der genutzten Kohlenstoffquellen wurde z.B. durch die starke Expression verschiedener Gene erkennbar, deren Genprodukte an der Glukoneogenese, dem Glyoxylat-Zyklus oder dem Glukose- und Maltosetransport (z.B. Hgt12p, Mal31p) beteiligt sind. Dies könnte auf einen Mangel an frei verfügbarer Glukose zurückzuführen sein. Auch bei der Phagozytose von *C. albicans* in Makrophagen konnte eine starke Induktion des Glyoxylat-Zyklus gezeigt werden, wobei Lorenz *et al.* postulierten, dass die Phagolysosomen eine sehr nährstoffarme Umgebung darstellen (Lorenz *et al.*, 2004; Prigneau *et al.*, 2003). Dies steht in Einklang mit verschiedenen experimentellen Studien in denen z.B. die starke Expression von *HGT12* unter Glukosemangelbedingungen oder die Unterdrückung des Glyoxylat-Zyklus bei hohen Glukosekonzentrationen gezeigt werden konnte (Barelle *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2002). Als alternative Kohlenstoffquelle bei der Interaktion mit dem Epithelgewebe könnten z.B. Lipide (Fettsäuren oder Phospholipide) verwendet werden, deren Abbau über Acetyl-CoA die Generierung von Glukose über die Glukoneogenese erlaubt. Dies wird untermauert durch die starke Expression von Genen, welche an der Lipolyse oder der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind. Die starke Expression dieser Gene vor allem während der mittleren und späten Phase der experimentellen Infektion könnte dabei bedeuten, dass diese Mechanismen vor allem während des invasiven Wachstums eine wichtige nahrungsphysiologische Rolle für *C. albicans* spielen. Diese Annahme wird unterstützt durch die ebenfalls starke Expression einiger Gene der β -Oxidation und der Lipolyse in den unterstützenden Experimenten mit dem disruptierten RHE. Bei diesen Versuchen hatten die Pilzzellen direkten Kontakt zu zerstörten Epithelzellstrukturen. Der alternative Abbau von Fettsäuren oder Phospholipiden zur Energiegewinnung wurde bereits bei anderen pathogenen,

vorwiegend intrazellulär proliferierenden Mikroorganismen, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* oder *C. neoformans* beschrieben (Fang *et al.*, 2005; Timm *et al.*, 2003; Rude *et al.*, 2002).

Auch die Expression verschiedener sekretierter hydrolytischer Enzyme erfolgte während der experimentellen RHE-Infektion phasenspezifisch auf hohem Niveau (z.B. *SAP5*, *LIP1*). Sekretierte hydrolytische Enzyme werden in *C. albicans* vor allem mit physiologischen Vorgängen (enzymatische Aufarbeitung von Nährstoffen) oder einem invasiven Wachstum (z.B. Lyse von Wirtsmembranen) in Verbindung gebracht (Hube and Naglik, 2001; Peberdy, 1999). Das vor allem die sekretierten Aspartatproteasen (Saps) eine wichtige Rolle für die Virulenz von *C. albicans* spielen, konnte bereits in mehreren Studien für verschiedene Infektionsmodelle gezeigt werden (Naglik *et al.*, 2003a). Bei der Interaktion mit dem oralen RHE-Gewebe scheinen vor allem die Proteine Sap1-3p eine wichtige Rolle zu spielen, da die Mutanten $\Delta sap1$, $\Delta sap2$ und $\Delta sap3$ eine verminderte Adhärenz an bukkale Epithelzellen sowie eine verminderte Gewebeschädigung im RHE-Modell zeigten (Naglik *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte für *SAP1-3* auf transkriptioneller Ebene in qRT-PCR-Studien keine starke Expression gezeigt werden, im Gegensatz zu *SAP4-6*, deren starke Expression vor allem mit der Hyphenmorphologie in Verbindung gebracht wird. Die Deletion der Gene *SAP4-6* führte jedoch zu keiner Attenuation der Virulenz im RHE-Modell (Naglik *et al.*, 2003a), was aufgrund der vielen Mitglieder der Sap-Familie (Sap1-10) möglicherweise auf kompensatorische Effekte zurückzuführen ist.

Während der mittleren und späten Phase der experimentellen Infektion waren ebenfalls Gene stark exprimiert, welche für Zink-, Phosphat- oder Aminosäuretransporter kodierten. Da Mineralien und Spurenelemente z.T. essenzielle Komponenten für das optimale Wachstum der meisten Zellen darstellen, gehört die Limitierung frei verfügbarer Mineralstoffe (z.B. Laktoferrin (Eisenchelator) oder Calprotektin (Zinkchelator) zu den zentralen Abwehrmechanismen höher entwickelter Organismen gegen pathogene Mikroorganismen (Okutomi *et al.*, 1998; Clohessy and Golden, 1995). Gerade die Verfügbarkeit von Zink scheint für einige humanpathogene Pilze wie z.B. *C. albicans*, *Candida glabrata* oder *A. fumigatus* eine wichtige Rolle zu spielen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Verfügbarkeit von Zink in verschiedenen Körperflüssigkeiten zu einer Wachstumsinhibierung der

untersuchten Pilze führte (Luloff *et al.*, 2004). Auch für einige pathogene Bakterien (*Salmonella enterica* oder *Brucella abortus*) konnte die Wichtigkeit von Zink für deren Virulenz gezeigt werden (Kim *et al.*, 2004; Campoy *et al.*, 2002). Die starke Expression der Zinktransporter während der experimentellen Infektion zeigte sich vor allem während der späten Zeitpunkte, was impliziert, dass vor allem während des invasiven Wachstums im oralen Epithelgewebe ein relativer Zinkmangel für *C. albicans* vorliegen könnte. Auch bei Phosphat handelt es sich um einen wichtigen, strukturellen Baustein, welcher z.B. für die Synthese von DNA benötigt wird und auch für die Virulenz verschiedener pathogener Mikroorganismen (z.B. *Mycobacterium* ssp., *S. typhimurium*) eine wichtige Rolle spielt (Peirs *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2000). Für den pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* spielt die Verfügbarkeit von Phosphat eine besonders wichtige Rolle. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Regulation des filamentösen Wachstums und der Virulenz in *U. maydis* über einen cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg in direkter Korrelation mit dem intrazellulären Phosphatgehalt verläuft (Boyce *et al.*, 2006). Auch bei *C. albicans* spielt die Regulation des filamentösen Wachstum über einen cAMP abhängigen Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle (Borges-Walmsley and Walmsley, 2000). Inwieweit dieses jedoch an die Verfügbarkeit von Phosphat gekoppelt ist, wurde in *C. albicans* noch nicht untersucht. Die hohe Expression der *high-affinity* Phosphattransporter in *C. albicans* fand vor allem während der mittleren Zeitpunkte der experimentellen Infektion statt. Dies deutet an, dass im Gegensatz zu Zink, möglicherweise kein relativer Phosphatmangel während der invasiven Wachstumsphase im Gewebe vorlag.

Die verstärkte Expression für Aminosäuretransporter kodierender Gene während der späten Phase der experimentellen RHE-Infektion könnte auf die Umstrukturierung des Metabolismus zurückzuführen sein und auf einen daraus resultierenden erhöhten Bedarf an Stickstoff und/oder Aminosäuren. Darüber hinaus könnte eine starke Expression von Genen welche für transmembrane (Transport-) Proteine kodieren möglicherweise auch eine verstärkte Interaktion und Wahrnehmung der Umgebung sowie der Kommunikation zwischen den *C. albicans* Zellen bedeuten (Lan *et al.*, 2002).

4.2.2.2 Induktion des Hyphenwachstums

Wie die mikroskopische Analyse der experimentellen Infektion gezeigt, war bei der Interaktion von *C. albicans* mit dem oralen Epithelgewebe eine starke Induktion der Hyphenbildung typisch. Dies spiegelte sich auch auf molekularer Ebene deutlich wieder. Gene, welche bereits *in vitro* als hyphenassoziiert identifiziert wurden (z.B. *HYR1*, *SOD5*, *ECE1*, *RBT1*) (Kadosh and Johnson, 2005; Nantel *et al.*, 2002), zeigten eine starke Expression über den gesamten Verlauf der experimentellen Infektion. Dies steht in Einklang mit verschiedenen Studien, in denen die Interaktion von *C. albicans* mit eukaryotischen Zelllinien (Makrophagen, Darm- oder Lungenepithelzellen) untersucht wurde. Auch in diesen Studien spiegelte die starke Expression hyphenassoziiierter Gene die mikroskopisch analysierte Hyphenbildung wider (Sohn *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2004). Auch einige der für Adhäsine kodierenden Gene waren sowohl während der frühen Phase als auch über den gesamten Verlauf der experimentellen Infektion auf hohem Niveau exprimiert, was die Wichtigkeit der Adhäsion für die *C. albicans* Zellen unterstreicht. Stark exprimiert waren vor allem Vertreter der ALS-Genfamilie (*ALS10*) (Hoyer, 2001). Deren starke Expression konnte bereits in anderen Studien in Verbindung mit der Infektion des oralen RHE-Modells gezeigt werden (Green *et al.*, 2004). Dies gilt ebenso für Hwp1p, einem sowohl für die Hyphenbildung als auch für die Adhäsion äußerst wichtigen Protein (Sundstrom, 2002; Tsuchimori *et al.*, 2000; Staab *et al.*, 1999b).

4.2.2.3 Stress und zelluläre Abwehrmechanismen

Bei der Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe exprimierte *C. albicans* während der späten Zeitpunkte Gene auf hohem Niveau (*SSUI*, *YHB1*), welche mit der Detoxifizierung reaktiver Stickstoffspezies (Stickstoffmonoxid, NO[•]) assoziiert sind. Eine spezifische Stressantwort der *C. albicans* Zellen auf oxidativen, osmotischen oder temperaturbedingten Stress konnte dagegen nicht beobachtet werden. NO[•] stellt eine wichtige Komponente für eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Vorgänge in humanen Wirtsgeweben oder phagozytisch aktiven Zellen (z.B. Makrophagen) dar, unter anderem bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen (Kendall *et al.*, 2001; Kendall *et al.*, 2000; Miller and Britigan, 1997). In

verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass NO[•] in murinen Infektionsmodellen bei der Abwehr von *C. albicans* einen entscheidenden Aspekt darstellt (Netea *et al.*, 2002; Elahi *et al.*, 2001). Dabei zeigten Mäuse mit Defekten in der zellulären NO[•] Produktion (*NOS2*^{-/-}) eine deutlich erhöhte Mortalität bei *C. albicans* Infektionen (Hromatka *et al.*, 2005). Entsprechend führte die Deletion des an der Detoxifizierung von NO[•] beteiligten Flavohemoglobins *YHB1* in *C. albicans* zu einer Attenuation der Virulenz dieser Mutante im Mausmodell (Hromatka *et al.*, 2005; Ullmann *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2002). Die starke Expression der mit der Detoxifizierung von NO[•] assoziierten Gene in *C. albicans* impliziert, dass NO[•] auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten oralen Epithelgewebe an der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen beteiligt ist. Dies steht auch in Einklang mit Studien in denen die Freisetzung von NO[•] durch (orale) Epithelgewebe als ein wichtiger und initialer Abwehrmechanismus identifiziert wurde (Kendall *et al.*, 2001; Kendall *et al.*, 2000).

Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass Yhb1p auch an der Regulation des filamentösen Wachstum in *C. albicans* beteiligt ist, da $\Delta yhb1$ Mutanten hyperfilamentöses Wachstum unter nicht hypheninduzierenden Bedingungen zeigten (Hromatka *et al.*, 2005). Dies untermauert zum einen die Wichtigkeit der NO[•]-Detoxifizierung für die Virulenz von *C. albicans* und verdeutlicht zum anderen die komplexe Regulation der für die Anpassung und die Virulenz wichtigen Komponenten in *C. albicans* (Kumamoto and Vines, 2005b). Wie bereits angesprochen, stellen NO[•]-assoziierte Abwehrmechanismen des Wirts für eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen eine große Herausforderung dar. So spielt NO[•] z.B. bei der Abwehr von *C. albicans* durch Makrophagen, bei der Wachstumsinhibierung des humanpathogenen Pilzes *H. capsulatum* oder bei der Abwehr verschiedener intrazellulär lokalisierter Bakterien (z. B. *S. typhimurium*, *B. abortus*, *Yersinia pestis* oder *Mycobacterium tuberculosis*) eine wichtige Rolle (Kikuchi *et al.*, 2006; Sebbane *et al.*, 2006; Nittler *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2004; Shiloh and Nathan, 2000).

4.2.2.4 pH-Wert abhängige Genregulation

Über den zeitlichen Verlauf der experimentellen Infektion des oralen RHE-Gewebes zeigten die *C. albicans* Zellen eine starke Expression spezifischer

Markergene, welche ein neutrales bis alkalisches pH-Milieu widerspiegeln. *PHR1* und *PRA1*, beides Gene für welche eine starke Expression unter alkalischen pH-Bedingungen bereits gezeigt werden konnte (Sentandreu *et al.*, 1998; Saporito-Irwin *et al.*, 1995), waren vor allem während der späten Phase der experimentellen Infektion auf hohem Niveau exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich *PHR2*, ein bei sauren pH Werten (<pH 5) exprimiertes Markergen (Mühlschlegel and Fonzi, 1997), zu keinem Zeitpunkt der experimentellen Infektion auf hohem Niveau exprimiert. Einhergehend mit der starken Expression dieser Markergene, konnte eine ganze Reihe von stark exprimierten Genen identifiziert werden, deren Expression unter alkalischen Umgebungsbedingungen in Mikroarraystudien bereits gezeigt werden konnte, darunter auch hyphen- und virulenzassoziierte Gene (Bensen *et al.*, 2004). Die Anpassung an verschiedene pH-Milieus stellt für *C. albicans* wie auch für eine Vielzahl anderer pathogener Mikroorganismen, eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Interaktion mit dem Wirt dar. So müssen z.B. *S. typhimurium*, *Helicobacter pylori* oder *Vibrio cholerae* Adaptations- oder Resistenzmechanismen gegen das stark saure pH-Milieu des Magens aufweisen, um den Durchgang der Magenpassage zu überstehen (Hung *et al.*, 2006; Rychlik and Barrow, 2005; Sachs *et al.*, 2005). Für *C. albicans*, welcher als humanpathogener Organismus eine Vielzahl verschiedener Mikronischen im menschlichen Körper besiedelt, konnte *in vivo* eine breite Anpassung an ein pH-Spektrum von pH 2-10 gezeigt werden (Odds, 1988). Dabei unterstützt ein saures pH-Milieu eher das Hefewachstum und ein neutral-alkalischer pH-Wert eher das filamentöse Wachstum in *C. albicans* (Odds, 1988). Die Regulation der pH-abhängigen Genexpression unter neutral-alkalischen Umgebungsbedingungen erfolgt in *C. albicans* über den *Rim101*-Signalweg (Davis, 2003). Interessanterweise werden über diesen Signaltransduktionsweg auch einige hyphen-, virulenz- sowie stoffwechselassoziierte Gene reguliert. *In silico* Analysen lassen eine direkte Abhängigkeit einiger dieser Gene zu *RIM101* vermuten, da in den Promotorbereichen dieser Gene mögliche Bindestellen für Rim101p identifiziert werden konnten (Bensen *et al.*, 2004). Eine Vielzahl der Gene, für die eine starke Expression unter alkalischen Umgebungsbedingungen *in vitro* gezeigt werden konnte, war auch bei der Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe stark exprimiert. Dies deutet an, dass ein neutral-alkalisches pH-Milieu möglicherweise einen wichtigen Stimulus bzw. eine optimale Umgebung für

die Persistenz einer Infektion darstellt. Hinsichtlich des Verlaufs der experimentellen Infektion könnten so, während der frühen Phasen der Interaktionen, der initiale Kontakt zwischen Pilz und Epithelzelle sowie möglicherweise temporärer Nährstoffmangel wichtige Stimuli für die Hyphenbildung und die Expression virulenzassoziierter Gene darstellen. Während der mittleren und späten Phase der Interaktion könnte die Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums, co-reguliert mit einer Vielzahl virulenz- und Stoffwechsellassoziierter Komponenten, möglicherweise durch das neutral-alkalische pH-Milieu des Gewebes unterstützt werden. Mutanten, in denen Komponenten des *RIM101*-Signalweges ausgeschaltet wurden ($\Delta rim101$ oder $\Delta rim8$), zeigten eine reduzierte Virulenz in murinen Infektionsmodellen. Weiterhin waren diese Mutanten attenuiert in der Fähigkeit, Hyphen unter alkalischen Umgebungsbedingungen ausbilden zu können, jedoch nicht unter anderen hypheninduzierenden Bedingungen wie z.B. Serum (Davis *et al.*, 2000b; Davis *et al.*, 2000a). Dies zeigt, dass ein neutral-alkalisches pH-Milieu begünstigend auf die Expression vieler verschiedener Faktoren wirkt, welche an der Interaktion mit dem Wirtsgewebe beteiligt sind.

4.2.3 Vergleichende Analyse der Transkriptionsprofile: experimentelle RHE Infektion vs. Patientenproben

Die Analyse der Transkriptionsprofile der *in vivo* Patientenproben offenbarte neben einer unerwartet großen Heterogenität unter den einzelnen Proben, einige grundsätzliche Übereinstimmungen zu den Transkriptionsprofilen der experimentellen Infektion, vor allem während der späten Zeitpunkte (12 h und 24 h). Dabei schien vor allem das neutral-alkalische pH-Milieu eine wichtige regulatorische Rolle bei der Interaktion mit oralen Epithelzellen zu spielen, da eine Vielzahl der Rim101p-regulierten Gene in beiden Probenpools vergleichbar stark exprimiert waren. Einige dieser stark exprimierten Gene konnten dabei als hyphenassoziiert charakterisiert werden, was andeutete, dass es sich auch bei den aus der Mundhöhle isolierten *C. albicans* Zellen vorwiegend um Zellen in der Hyphenmorphologie handelte. Dies konnte auch durch die mikroskopischen Analysen einiger Patientenproben bestätigt werden, in welchen die Hyphenmorphologie als die dominierende Wachstumsform der *C. albicans* Zellen

identifiziert wurde (persönliche Mitteilung A. Schmidt-Westhausen, vgl. Ergebnisse, Abbildung 17).

In Korrelation mit der Hyphenmorphologie und einem möglicherweise starken invasiven Wachstum der *C. albicans* Zellen, waren in den oralen Patientenproben einige, für hydrolytische Enzyme kodierende Gene stark exprimiert (z.B. *PLD1*, *SAP4*, *SAP5*, *PLB3*). Wie bereits beschrieben, stellen hydrolytische Enzyme möglicherweise wichtige Komponenten für die Penetration des Wirtsgewebes dar. Für *PLD1* konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion zu einem reduzierten invasiven Wachstum sowie zu einer attenuierten Hyphenbildung der *C. albicans* Zellen führte (Dolan *et al.*, 2004; Hube *et al.*, 2001). Da es sich bei Pld1p jedoch wahrscheinlich um kein sekretorisches Enzym handelt, ist dieses Enzym möglicherweise eher für ein intaktes Hyphenwachstum der *C. albicans* Zellen wichtig (Hube *et al.*, 2001). Die Proteasen Sap4-6 wurden auch von Naglik *et al.* durch qRT-PCR Studien als die vorherrschend exprimierten Proteasen in oralen Patientenproben identifiziert (Naglik *et al.*, 2003b; Naglik *et al.*, 1999). Auch für die Virulenz anderer pathogener Organismen wie z.B. *C. neoformans* spielen sekretorische Proteasen eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Wirtsgewebe. So zeigten *in vivo* isolierte *C. neoformans* Zellen eine starke Expression sekretorischer Proteasen, welche ebenfalls mit den invasiven und gewebezestörenden Eigenschaften dieser Pilzzellen assoziiert wurden (Vidotto *et al.*, 2005).

Einen wichtigen Aspekt bei der Interaktion mit Wirtsgewebe scheint auch die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen darzustellen. Die Transkriptionsprofile der in dieser Arbeit untersuchten oralen Infektionen (*in vivo* und *in vitro*) sowie die bei der Interaktion mit Makrophagen oder der *ex-vivo* Infektion von porciner Leber erstellten Transkriptionsprofile, spiegelten in allen Fällen einen relativen Glukosemangel der *C. albicans* Zellen wider (Thewes *et al.*, 2007; Lorenz *et al.*, 2004). Eine wichtige Rolle schien dabei in allen Studien die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen zu spielen, welcher durch die verstärkte Expression von Genen kodierend für Komponenten des Glyoxylat-Zyklus der Glukoneogenese, der Lipolyse oder der β -Oxidation impliziert wurde. Dieses Prinzip der Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen konnte auch schon für eine Reihe anderer bakterieller Mikroorganismen gezeigt werden (Barelle *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2005; Rude *et al.*, 2002).

Nitrosativer Stress, verursacht durch reaktive Stickstoffspezies, wurde in den *C. albicans* Zellen auch bei der Interaktion mit dem oralen Gewebe *in vivo* induziert. Dies deutet an, dass NO^{*} auch *in vivo* eine wichtige Rolle bei der epithelialen Abwehr von *C. albicans* spielt, so wie es auch für andere Mikroorganismen beschrieben werden konnte (Kendall *et al.*, 2001; Kendall *et al.*, 2000).

Von besonderer Relevanz bei den *in vivo* isolierten Proben scheint die Verfügbarkeit von Eisen zu sein, da Gene für hoch-affinen Eisentransporter der *C. albicans* Zellen nur in den *in vivo* Patientenproben stark exprimiert wurden. Dieses wurde in der Arbeit von Thewes *et al.* bestätigt, bei der in einer *ex-vivo* durchgeführten Gewebeeinfektion ebenfalls eine starke Expression bestimmter, für Eisentransporter kodierender Gene gezeigt werden konnte (Thewes *et al.*, 2007). Die Verfügbarkeit von Eisen stellt für viele Mikroorganismen einen essentiellen Aspekt bei der Interaktion mit Wirtsgewebe dar (Schaible and Kaufmann, 2004). Abwehrmechanismen gegen *C. albicans* und andere Mikroorganismen basieren daher oft auf der Limitierung frei verfügbaren Eisens durch die Wirtszellen (Weissman and Kornitzer, 2004). Pathogene Bakterien wie z.B. *M. tuberculosis*, *Y. pestis* oder *S. typhimurium* besitzen infolgedessen hochentwickelte Systeme mit denen sie durch den Wirt gebundenes Eisen für eigene Zwecke nutzen können (Sebbane *et al.*, 2006; Collins, 2003). Auch *C. albicans* besitzt eine Reihe hoch-affiner Eisentransporter. Die entsprechenden Gene waren in den Patientenproben auf hohem Niveau exprimiert, was deren Wichtigkeit *in vivo* unterstreicht. Möglicherweise spielen eisenlimitierende Abwehrmechanismen durch antimikrobielle Proteine vor allem *in vivo* eine wichtige Rolle (z.B. Laktoferrin im Speichel), welche *in vitro* aufgrund des Fehlens antimikrobieller Komponenten des Speichels keine Rolle spielten. Interessanterweise konnte auch für die Expression für Zinktransporter kodierender Gene eine Regulation durch Rim101p und ein neutral-alkalisches pH-Milieu gezeigt werden (Bensen *et al.*, 2004). Dieses Prinzip der pH-korrelierten Kationenaufnahme scheint dabei einen konservierten Mechanismus bei einer Reihe verschiedener Pilzspezies darzustellen. Auch bei *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus nidulans* konnte eine Rim101p abhängige Regulation der Eisenaufnahme unter alkalischen Umgebungsbedingungen identifiziert werden (Eisendle *et al.*, 2004; Lamb and Mitchell, 2003; Lamb *et al.*, 2001). Die unter alkalischen pH-Bedingungen stark

exprimierten, eisenassoziierten Gene von *C. albicans* kodieren für diverse hoch-affine Transporter sowie Eisenreduktasen, welche das unter alkalischen Umgebungsbedingungen vorliegende, schwer lösliche Fe^{3+} in die löslichere und leichter zugänglichere Fe^{2+} Form reduzieren und aufnehmen können.

Insgesamt zeigte die vergleichende Analyse der Transkriptionsprofile der Patientenproben mit den Transkriptionsprofilen der experimentellen Infektion eine Reihe grundlegender Übereinstimmungen. Vor allem die mittlere und späte Phase (6-24 h) der experimentellen Infektion spiegelt möglicherweise die Situation während einer oralen Infektion *in vivo* wieder. Die erstellten Transkriptionsprofile der späten Phase der *in vivo* als auch der *in vitro* Infektionen zeigten dabei übereinstimmend eine adaptive Interaktion an ein neutral-alkalisches pH-Milieu, bestimmte Kohlenstoffquellen oder spezifische Wirtsabwehrmechanismen wie reaktive Stickstoffspezies (NO^{\cdot}). Basierend auf den erstellten Transkriptionsprofilen und den mikroskopischen Analysen, scheint das epitheliale RHE-Gewebe somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung der basalen, zellulären Interaktionen zwischen Pilzzellen und Epithelzellen darzustellen. Aufgrund des sterilen Charakters (keine bakterielle Mikroflora) können sich die Pilzzellen im RHE-Modell ohne Einschränkungen ausbreiten und massenhaft vermehren, so wie es auch während einer oralen Infektion in immunsupprimierten Patienten *in vivo* stattfindet. Die experimentellen Einschränkungen dieses Modells liegen darin, dass die, die Interaktionen zwischen Pilzzellen und Epithelgewebe beeinflussenden Komponenten wie z.B. Speichel, die bakterielle Mikroflora oder antimikrobielle Peptide gänzlich fehlen. Dies wird z.B. dadurch reflektiert, dass bestimmte eisenassoziierte Gene zwar *in vivo* nicht aber *in vitro* stark exprimiert wurden.

Die frühe Phase der experimentellen RHE Infektion bietet indess die Möglichkeit, initiale Interaktionen zwischen Pilzzellen und Epithelgewebe zu untersuchen. Da eine Inokulation des RHE Modells immer eine Infektion verursacht, kann das Modell aber nicht mit der asymptomatischen Kolonisierung in nicht erkrankten Trägern verglichen werden. Die Interaktion von *C. albicans* mit dem oralen Epithelgewebe gesunder Menschen *in vivo* ist vielmehr in ein komplexes und interaktives System eingebettet, welches bakterielle Bestandteile der Mikroflora sowie zelluläre und immunologische Abwehrmechanismen des Wirtes beinhaltet und normalerweise eine massenhafte Vermehrung der Pilzzellen verhindert. Die

Entwicklung eines *steady-state*- Modells, welches *in vitro* die Untersuchung der asymptomatischen Kolonisierung durch *C. albicans* erlaubt, dürfte daher experimentell eine große Herausforderung darstellen. Auch eine intensive Analyse von *C. albicans* Zellen aus der Mundhöhle von nicht erkrankten Personen (*carrier*) stellt aufgrund des sehr begrenzten Probenmaterials sowie einer starken „Kontamination“ durch Komponenten der Mikroflora, eine Herausforderung dar. Erste Analysen von *C. albicans* als Kommensale wurden von Naglik *et al.* in einer qRT-PCR basierte Studie zur Untersuchung der *SAP*-Expression von *C. albicans* Zellen, isoliert aus dem Speichel gesunder Probanden, durchgeführt (Naglik *et al.*, 1999). Eine globale Transkriptomanalyse der *C. albicans* Zellen während der asymptomatischen Kolonisierung wurde bis heute noch nicht durchgeführt. Eine Möglichkeit diesbezüglich dürfte in Zukunft in *laser-capture*-basierten Technologien bestehen, welche die Isolation kleinerer Subpopulationen oder sogar einzelner Zellen erlaubt.

4.3 Molekularbiologische Charakterisierung der potentiell infektionsassoziierten Gene in *C. albicans*

4.3.1 Herstellung von Deletionsmutanten in *C. albicans*

Da es sich bei *C. albicans* um einen diploiden Organismus handelt, müssen für die Erstellung genspezifischer Deletionsmutanten beide Allele des jeweiligen Gens ausgeschaltet werden. Die traditionell für Gendeletionen verwendete Methode in *C. albicans*, die „URA-Blaster Methode“, basiert auf der Deletion und Regeneration eines bestimmten Selektionsmarkers, dem Auxotrophiemarker *URA3* (Fonzi and Irwin, 1993). Als kritischer Punkt bei dieser Methode kristallisierte sich jedoch der sogenannte „URA-Effekt“ heraus. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von *URA3* eine Attenuierung der Virulenz und des Adhäsionsvermögens der *C. albicans* Zellen bewirkte (Brand *et al.*, 2004; Bain *et al.*, 2001). Dieses Problem konnte jedoch durch eine gezielte Integration des *URA3* Gens in den *RPS1* Locus der *ura⁻* *C. albicans* Stämme gelöst werden (Brand *et al.*, 2004). Warum der „URA-Effekt“ durch eine Expression des *URA3* Gens am *RPS1* Locus aufgehoben wird, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die

Expressionsstärke am *RPS1* Locus der am nativen *URA3* Locus entspricht (Brand *et al.*, 2004). Alternative Methoden zur Gendeletion in *C. albicans*, so wie die in dieser Arbeit verwendete Methode des „*PCR based gene targeting*“, basieren daher auf der ektopen Expression anderer Selektionsmarker wie z.B. *HIS1* und *ARG4* in *C. albicans* (Gola *et al.*, 2003). Bis heute wurden noch keine „Markereffekte“ (spezifische Phänotypen die alleine auf die ektopen Expression der Selektionsmarker zurückzuführen sind) für die Selektionsmarker *HIS1* und *ARG4* beschrieben. Hinsichtlich potentiell möglicher Markereffekte ist es jedoch wichtig, möglichst nur Stämme mit ähnlichem oder gleichem genetischen Hintergrund und Markerstatus miteinander zu vergleichen.

Für die Herstellung der Deletionsmutanten in dieser Arbeit wurde der *C. albicans* Stamm BWP17 (Wilson *et al.*, 1999) verwendet, welcher Deletionen der Gene *URA3*, *ARG4* und *HIS1* besitzt und daher die Verwendung dieser drei Auxotrophiemarker erlaubt. Wie im Material- und Methodenteil beschrieben (Abschnitt 2.2.19.9: Herstellung von Deletionsmutanten), erfolgte die Deletion der Zielgene durch die Integration der Auxotrophiemarker an deren nativen Genloki. Die Regeneration des Selektionsmarkers *URA3* erfolgte über die beschriebene Expression am *RPS1* Locus. Als ein möglicher Kontrollstamm wurden in dem Ausgangsstamm BWP17 alle Selektionsmarker im *RPS1* Locus regeneriert und dieser Stamm als „parentaler Stamm“ bezeichnet (BWP17+Clp30). Streng genommen handelt es sich bei diesem Stamm nicht um den parentalen Stamm, sondern um einen derivativen Stamm, da sich die Selektionsmarker *HIS1* und *ARG4* in diesem Stamm am *RPS1* Locus befinden und nicht, wie bei den Mutanten, an ausgewählten Loci im Genom. Daher wurden alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ebenfalls mit dem Wildtyp (SC5314) als Kontrollstamm durchgeführt. Der parentale Stamm verhielt sich in den verschiedenen Experimenten jedoch weitestgehend wie der Wildtypstamm. Etwaige geringfügige Abweichungen (leicht verlangsamtes Wachstum in Minimalmedium oder eine geringfügige nicht signifikant verringerte Virulenz im RHE Modell) waren dabei wahrscheinlich auf additive Effekte der ektopen Expression aller Selektionsmarker zurückzuführen.

4.3.2 Die Mutanten *Δipf14895* und *Δipf6758* zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber zellwand-destabilisierender Agenzien

Um Informationen über die möglichen Defekte der in dieser Arbeit erstellten Deletionsmutanten zu erhalten, wurden diese einem breiten Phänotypenscreening unterzogen. Dazu wurden die *C. albicans* Zellen auf verschiedenen Medien ausgetropft und visuell auf mögliche Wachstumsdefekte hin analysiert. Die mit dieser Methode untersuchten Mutanten *Δipf14895* und *Δipf6758* zeigten einen eindeutigen Wachstumsdefekt auf Medien mit Zusätzen welche die Zellwand oder die Zellmembran der Pilzzellen angriffen. Interessanterweise zeigte jedoch nur die Mutante *Δipf14895* eine abgeschwächte Virulenz im RHE-Modell.

Durch *in silico* Analysen der Aminosäuresequenz von Ipf14895p konnten einige wenige Hinweise auf mögliche Funktionen dieses Proteins gewonnen werden. Ein identifiziertes CHCH (coiled coil-helix) Motiv in der Aminosäuresequenz von Ipf14895p konnte auch in einigen mitochondrial lokalisierten Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert werden (z.B. Cox19p, Cox17p) (Marchler-Bauer *et al.*, 2005). In wieweit mögliche mitochondriale Defekte mit den zellwandassoziierten Defekten der *Δipf14895* Mutante korreliert sind, ist jedoch noch unklar. Um mögliche mitochondriale Defekte der *Δipf14895* Mutante weiter zu spezifizieren, müssten weiterführende Experimente, wie z.B. das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen, durchgeführt werden.

Bei dem Genprodukt des ORF *IPF6758* handelt es sich um ein potentiell membrangebundenes Protein. Experimentell konnte für die *Δipf6758* Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber zellwanddestabilisierenden Agenzien determiniert werden. *In silico* Analysen der Aminosäuresequenz offenbarten jedoch keine konservierten Domänen oder signifikante Blast Ergebnisse zu verwandten Proteinen aus anderen Mikroorganismen. Da sich die Deletion dieses Gens nicht negativ auf die Fähigkeit der Gewebeschädigung auswirkt, scheint die Relevanz dieses Gens für die Etablierung einer oralen Infektion *in vitro* gering zu sein.

4.3.3 Die Mutanten *Δipf2147*, *Δipf12297*, *Δipf2830*, *Δipf14155* und *Δmal31* zeigen kaum verminderte Virulenz bei den Interaktionen mit dem oralen Epithelgewebe (RHE)

Die Mutanten *Δipf2147*, *Δipf12297*, *Δipf2830*, *Δipf14155* und *Δmal31* zeigten bei allen untersuchten Medien und Chemikalien keine eindeutigen Veränderungen und nur zwei der Mutanten (*Δipf2147* und *Δmal31*) hatten leicht attenuierte Fähigkeiten Gewebeschädigung im RHE-Modell hervorzurufen.

Bei dem Genprodukt des ORF *MAL31* handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Maltosetransporter, da für das Protein ein entsprechendes Ortholog in *S. cerevisiae* identifiziert werden konnte (*Mal31p*) (Charron *et al.*, 1989). Weiterhin konnte durch Blast Analysen ein für Zuckertransporter hochkonserviertes Motiv innerhalb der Aminosäuresequenz identifiziert werden. Da für die *Δmal31* Mutante keine Wachstumsdefekte auf den untersuchten Medien *in vitro* identifiziert werden konnten und *C. albicans* über eine Vielzahl verschiedener Glukose- und Maltosetransporter verfügt, könnten kompensatorische Effekte durch andere Kohlenstofftransporter eine wichtige Rolle spielen. Bei der Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe könnte die fehlende Aktivität dieses Transporters einen generellen Fitnessverlust bedeuten, welcher sich in der determinierten, leicht verminderten Fähigkeit Gewebeschädigung hervorzurufen, manifestiert.

Die Mutante *Δipf12297* zeigte eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber bestimmten zellwanddestabilisierenden Agenzien. Blast-Analysen der Aminosäuresequenz identifizierten ein konserviertes CFEM-Motiv, eine cysteinreiche Domäne, welche in einer Reihe fungaler, zellwandassoziiierter Proteine identifiziert werden konnte (z.B. verschiedene GPI-verankerte oder zellwandassoziierte Proteine in *M. grisea*, *Neurospora crassa* oder *C. albicans*) (Marchler-Bauer *et al.*, 2005). Weiterhin konnten in verschiedenen Transkriptomstudien eine pH-responsive, sowie NO[•]-responsive Regulation dieses Gens gezeigt werden (Hromatka *et al.*, 2005; Bensen *et al.*, 2004), so dass es sich bei diesem Protein möglicherweise um ein zellwandassoziiertes Sensorprotein handelt. Die Funktion von *Ip12297p* scheint jedoch *in vitro* bei der Interaktion mit oralem Epithelgewebe nicht von Bedeutung zu sein.

Die Mutante *Δipf14155* verhielt sich *in vitro* unter keiner der untersuchten Bedingungen attenuiert im Wachstum. *In silico* Analysen der Aminosäuresequenz zeigten einige konservierte RNA Binde- und Erkennungsmotive, so dass es sich bei Ipf14155p möglicherweise um ein RNA-Bindeprotein handelt. Aufgrund der nach wie vor starken Fähigkeit Gewebeschädigung im epithelialen Gewebemodell hervorzurufen, scheint sich die Deletion von *IPF14155* nicht auf die Fitness der *C. albicans* Zellen auszuwirken. Im Gegensatz dazu führte die Deletion des ORF *IPF2147* in *C. albicans* zu einer leicht attenuierten Fähigkeit, Gewebeschädigungen hervorzurufen. Für das Protein Ipf2147p konnte jedoch kein orthologes Protein in *S. cerevisiae* sowie keinerlei konservierte Domänen oder Motive identifiziert werden, so dass keinerlei Spekulationen über mögliche Funktionen dieses Proteins angestellt werden können.

4.4 Ein neu identifiziertes, potentiell an der Regulation des Hyphenwachstums beteiligtes Gen in *C. albicans*: *EED1*

4.4.1 Die *Δeed1* Mutante zeigt Defekte in der Hyphenbildung *in vitro*

Auf Grund der starken Expression in der frühen Phase (1 h) und der späten Phase (12 h – 24 h) der experimentellen RHE-Infektion sowie einer erhöhten Expression in den Patientenproben, wurde das Gen *EED1* für weiterführende Analysen ausgewählt. Als Arbeitshypothese erschloss sich daraus eine mögliche wichtige Funktion dieses Genproduktes für die Initiation und Etablierung oraler Infektionen. In verschiedenen Untersuchungen der *Δeed1* Mutante *in vitro* konnten erste Erkenntnisse über die Funktion des Gens gewonnen werden. Die Mutante zeigte dabei einen Defekt in der Fähigkeit, Hyphen ausbilden zu können. Untersucht wurde eine Bandbreite verschiedener hypheninduzierender Stimuli, da das Hyphenwachstum in *C. albicans* über verschiedene Signaltransduktionswege, teilweise unabhängig voneinander, induziert und reguliert werden kann (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.4.1: Polymorphismus). Zusätzlich zu Untersuchungen des filamentösen Wachstums in Flüssigmedium, wurde das filamentöse Wachstum der

Δeed1 Mutante unter eingebetteten, semiaeroben Bedingungen untersucht. Auch unter diesen Bedingungen bildete die Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp, dem parental Stamm und der Retransformante kaum Hyphen.

Die gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass durch die Deletion des Gens *EED1* ein zentraler Defekt in der Hyphenbildung von *C. albicans* entstanden ist. Wie in der Einleitung beschrieben (Abschnitt 1.4.1.1: Regulation des Dimorphismus), wird das filamentöse Wachstum in *C. albicans* über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert. Dabei konnte für einige Gene eine regulatorische Schlüsselfunktion gezeigt werden. Die Deletion dieser Gene führte jedoch meist nicht zu einem vollständigen Defekt des Hyphenwachstums in den jeweiligen Mutanten. Zellen, in denen *EFG1*, eines der zentralen Regulatorgene des Hyphenwachstums in *C. albicans*, ausgeschaltete wurde, zeigten ein attenuiertes Hyphenwachstum unter fast allen Bedingungen *in vitro*, wuchsen jedoch hyperfilamentös unter semiaeroben Bedingungen (Giusani *et al.*, 2002). Die Deletion eines weiteren zentralen Regulatorgens, *CPH1*, führte lediglich zu schwach modifizierten Phänotypen, welche mit einem leicht attenuierten Hyphenwachstum korreliert waren (Csank *et al.*, 1998). Die Deletion beider Regulatorgene, *CPH1* und *EFG1*, führte *in vitro* zu einem vollkommen defizienten Hyphenwachstum und avirulenten Mutanten in murinen Infektionsmodellen (Lo *et al.*, 1997). In Infektionsversuchen mit murinem Zungengewebe zeigten die Zellen der Doppelmutante jedoch nach wie vor invasives Wachstum (Riggle *et al.*, 1999), da das filamentöse Wachstum unter semiaeroben (eingebetteten) Bedingungen und bei Kontakt zu (epithelialen) Oberflächen über andere, teilweise unabhängige Signalwege, reguliert wird. Die Regulation der Morphogenese unter eingebetteten Bedingungen erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Czf1p (Brown *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den Deletionsmutanten *Δefg1* und *Δcph1* zeigt die *Δczf1* Mutante Defekte im Hyphenwachstum unter eingebetteten Bedingungen und normales filamentöses Wachstum unter alternativen hypheninduzierenden Bedingungen (Vinces *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 1999). Eine Mutante, in der die Regulatoren Czf1p und Cph1p ausgeschaltet wurden, zeigte defizientes filamentöses Wachstum unter den meisten hypheninduzierenden Bedingungen, jedoch nach wie vor filamentöses Wachstum bei 37°C in Serum (Brown *et al.*, 1999). Die Deletion der verschiedenen Schlüsselgene verdeutlicht, dass kompensatorische Effekte bei der Regulation des Hyphenwachstums in

C. albicans eine wichtige Rolle spielen und zeigt die unterschiedlichen regulatorischen Ebenen, mit denen die verschiedenen hypheninduzierenden Stimuli, teilweise unabhängig voneinander, verarbeitet werden (Kumamoto and Vences, 2005a). Die $\Delta eed1$ Mutante zeigte ein defizientes filamentöses Wachstum unter allen untersuchten Stimuli *in vitro* sowohl in Flüssigkulturen als auch eingebettet, unter semiaeroben Bedingungen. Dies impliziert, dass es sich bei Eed1p um eine zentrale Komponente des Hyphenwachstums in *C. albicans* handelt, deren Fehlen durch alternative Regulationsmechanismen nicht kompensiert werden kann.

Bestimmte Stimuli des filamentösen Wachstums werden in *C. albicans* über den cAMP/PKA Signalweg in der Zelle verarbeitet (Whiteway and Oberholzer, 2004). Mutanten mit Defekten in diesem Signaltransduktionsweg (z.B. $\Delta cdc35$, $\Delta gpr1$, $\Delta gpa2$ oder $\Delta cap1$) sind charakterisiert durch ein defektes filamentöses Wachstum sowie einer reduzierten Virulenz. Diese Phänotypen sind jedoch reversibel und lassen sich durch die Zugabe von exogenem cAMP aufheben (Maidan *et al.*, 2005a; Maidan *et al.*, 2005b; Bahn and Sundstrom, 2001; Rocha *et al.*, 2001). Das defiziente filamentöse Wachstum der $\Delta eed1$ Mutante ließ sich durch die Zugabe von exogenem cAMP nicht wiederherstellen. Für einige Komponenten des cAMP/PKA Signalweges wurde auch eine Beteiligung der Regulation des Wachstums unter eingebetteten Bedingungen diskutiert. Die experimentellen Ergebnisse spiegeln jedoch eine kontroverse Datenlage wider, da einige Studien eine Induktion und einige Studien eine Repression der *CZF1* Expression nach Zugabe von exogenem cAMP beobachteten (Cao *et al.*, 2006; Maidan *et al.*, 2005b; Miwa *et al.*, 2004). Für die $\Delta eed1$ Mutante konnte keine Induktion des filamentösen Wachstums unter eingebetteten Bedingungen, nach Zugabe von exogenem cAMP beobachtet werden. Dies impliziert, dass es sich bei *EED1* wahrscheinlich um keine spezifische Komponente des cAMP/PKA Stoffwechselweges handelt.

Neben den verschiedenen bereits beschriebenen Stimuli, welche den Hefe/Myzel Übergang in *C. albicans* induzieren, gehören auch *Quorum sensing* Phänomene einschließlich QSM (*Quorum sensing molecules*) zu regulatorischen Komponenten (Nickerson *et al.*, 2006). Für die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante konnte keine durch *Quorum sensing* Effekte induzierte Hyphenbildung beobachtet werden. Selbst die Zugabe von Tyrosol, einem das filamentöse Wachstum

induzierende QSM, führte zu keiner Hyphenbildung in den Mutantenzellen. Auch das Wachstum in der Chlamydosporenmorphologie konnte in den Zellen der *Δeed1* Mutante nicht induziert werden. Die Regulation der Morphogenese, induziert durch die *Quorum sensing* aktiven Moleküle, ist für *C. albicans* noch weitestgehend unbekannt. Gleiches gilt für die Regulation des Wachstums in der Chlamydosporenmorphologie. Für beide Mechanismen wird jedoch eine Regulation über die sogenannten Zwei-Komponenten Systeme diskutiert. Dies beruht auf den Beobachtungen, dass Farnesol, ein QSM, welches das Hyphenwachstum inhibiert und das Chlamydosporenwachstum induziert, wahrscheinlich über Chk1p, einer cytoplasmatischen Histidinkinase, in den *C. albicans* Zellen verarbeitet wird (Martin *et al.*, 2005; Kruppa *et al.*, 2004). Aufgrund von *in silico* Sequenzanalysen ist es jedoch unwahrscheinlich, dass es sich bei *EED1* um ein Gen handelt, welches für Sensorproteine oder Proteinkinasen kodiert. Obwohl die Regulation der Morphologie der Chlamydosporen auf molekularer Ebene nicht annähernd so detailliert untersucht ist wie die der Hyphenmorphologie, konnten einige Überschneidungen in den die Morphologie regulierenden Signaltransduktionswegen beschrieben werden. *In vitro* erfolgt die Erzeugung der Chlamydosporen nur über die Induktion des Hyphenwachstums, die reifen Chlamydosporen unterscheiden sich morphologisch jedoch deutlich von den Hyphen (Martin *et al.*, 2005). Verschiedene Studien zeigten, dass einige in der Hyphenbildung defiziente Mutanten (*Δefg1*, *Δhog1*) hyperfilamentös waren unter Bedingungen, welche das Chlamydosporenwachstum induzieren (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Nobile *et al.*, 2003; Sonneborn *et al.*, 1999). Da Efg1p eine regulatorische Schlüsselkomponente des Hyphenwachstums darstellt, könnten durchaus auch weitere regulatorische Komponenten des Hyphenwachstums eine Rolle bei der Induktion der Chlamydosporenmorphologie spielen.

Die Expression von *EED1* scheint sowohl bei der Induktion der Chlamydosporenmorphologie als auch bei der Induktion der Hyphenmorphologie in verschiedenen Flüssigmedien oder durch *Quorum sensing*-Phänomene eine wichtige Rolle zu spielen. Auf Grund des generellen Defekts der *Δeed1* Mutante, Hyphen bilden zu können, liegt die Vermutung nah, dass es sich bei Eed1p um eine zentrale, regulatorische Komponente des Hyphenwachstums handelt. Das defekte Chlamydosporenwachstum lässt sich möglicherweise über

Überschneidungen in den Signaltransduktionswegen erklären, welche an der Elongation der Zellen beteiligt sind, da die Chlamydosporen *in vitro* nur über die Hyphenmorphologie induziert werden können (Khan *et al.*, 2004; Jitsurong *et al.*, 1993).

Dass es sich bei Eed1p wahrscheinlich eher um eine regulatorische Komponente als um einen strukturellen Baustein der Hyphenmorphologie handelt, wird durch die strukturelle Analyse der Aminosäuresequenz impliziert. Die *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz von Eed1p ergab keinerlei bekannte Motive oder konservierte funktionelle Domänen. Basierend auf den durchgeführten Blast-Analysen handelt es sich bei Eed1p wahrscheinlich vielmehr um eine mit dem Nukleus und/oder DNA-Strukturen assoziierte Komponente (vgl. Abschnitt 4.6: Strukturelle Ähnlichkeiten des Proteins Eed1p zu Proteinen aus anderen Organismen).

4.4.2 Transiente Elongation der $\Delta eed1$ Mutante *in vitro*

In Übernachtkulturen (Flüssigmedien) und Tropftestanalysen unter hypheninduzierenden Bedingungen zeigten die Zellen der $\Delta eed1$ Mutante einen dramatischen Defekt im filamentösen Wachstum: nahezu alle Zellen wuchsen nach der Inkubation als Hefezellen. Um zu untersuchen, ob die Zellen einen generellen Defekt in der Elongation aufweisen oder ob die Mutante zumindest transient Filamente ausbilden kann, wurde die Mutante unter verschiedenen hypheninduzierenden Bedingungen inkubiert und die Zellen stündlich mikroskopisch analysiert. Bei der Analyse der Zellen nach Inkubation in 10% Serum oder einer Verdünnung einer Übernachtkultur in 37°C vorgewärmtes YPD-Medium (*Quorum sensing* Effekte) konnten zu keinem Zeitpunkt elongierte Hyphenzellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine Inkubation in den Flüssigmedien M199 (pH 7,0) oder RPMI1640+10% Serum eine transiente Elongation der Zellen. Die Elongation der Zellen in diesen Medien war jedoch über einen Zeitraum von 5 h nicht stabil. Der Grund für die transiente Elongation der Zelle in den genannten Medien könnte auf die unterschiedliche Stimulation des Hyphenwachstums zurückzuführen sein. Die Stimulation des Hyphenwachstums durch Serum erfolgt wahrscheinlich über den MAPK-Signalweg, da dieses möglicherweise auf einen Mangel an frei verfügbarem Stickstoff und Kohlenstoff

(„Hunger“) zurückzuführen ist (Hudson *et al.*, 2004). In den Medien M199 und RPMI1640+10% Serum wurde das Hyphenwachstum ausschließlich (M199 Medium) bzw. zusätzlich (RPMI1640 + 10% Serum) durch den Stimulus des alkalischen pH-Wertes stimuliert, der über einen gesonderten Signaltransduktionsweg, den *RIM101*-Weg, reguliert wird (Bensen *et al.*, 2004; Ramon *et al.*, 1999). Durch die Verstärkung des Stimulus könnten somit kompensatorische Effekte zum Tragen kommen, die zumindest eine transiente Elongation der *Δeed1* Zellen ermöglichte. Dies impliziert, dass *EED1* eine besondere Rolle bei der Induktion des Hyphenwachstums durch den Stimulus Serum, über den MAPK-Signalweg, zukommen würde. Diese Annahme wird durch die bereits publizierten Transkriptionsprofile unterstützt. In diesen Studien zeigte sich eine sehr starke Expression von *EED1*, vor allem in den frühen Phasen der Inkubation in Serum, die sich über den zeitlichen Verlauf (bis 6 h) deutlich verringerte (Kadosh and Johnson, 2005; Nantel *et al.*, 2002). Zudem wirkte sich die Deletion der regulatorischen Gene *EFG1* und *CPH1*, von denen *CPH1* eine Schlüsselkomponente des MAPK-Weges darstellt, negativ auf die Expression von *EED1* aus (Nantel *et al.*, 2002). Für die Initiation der Hyphenbildung in Serum könnte *EED1* somit eine zentrale Rolle spielen. Der Verlust von *EED1* könnte bei Stimulationen alternativer Signalwege, z.B. des *RIM101*-Signalweges, zumindest teilweise kompensiert werden.

Die Elongation der Hyphenzellen erfolgte jedoch auch bei starken Stimuli nur transient. Über einen Zeitraum von 5 h hinaus konnten keine elongierten Zellen detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass *EED1*, unabhängig von den verschiedenen Stimuli, eine essentielle Komponente für das anhaltende filamentöse Wachstum in *C. albicans* darstellt. Die in dieser Arbeit erstellten Transkriptionsprofile unterstützen diese Annahme. Die Expression von *EED1* war sowohl während des frühen als auch des späten Zeitpunktes der experimentellen Infektion (1 h und 24 h) quantitativ am stärksten. Interessanterweise konnte für die Regulation des filamentösen (Pseudohyphen-) Wachstums in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass der cAMP-Signalweg vor allem für die Regulation der unipolaren Sprossungsvorgänge und der MAPK-Signalweg vor allem für die stabile Elongation der Zellen verantwortlich ist (Pan and Heitman, 1999). Eed1p könnte somit, als möglicherweise regulatorischer Bestandteil des MAPK-Signalweges, sowohl eine wichtige Rolle bei der Initiation des Hyphenwachstums

auf bestimmte Stimuli hin spielen, als auch eine essentielle Komponente für das dauerhafte Wachstum in der Hyphenmorphologie darstellen.

Hinsichtlich der morphologischen Ausprägung unterschieden sich die Elongationen der $\Delta eed1$ Mutante teilweise deutlich von den Hyphen der Kontrollstämme. Diese Elongationen der Mutante waren breiter und von deutlichen Einschnürungen unterbrochen. Breitere Zellen sowie Einschnürungen innerhalb der Elongationen stellen neben einer modifizierten Verteilung der Organellen und einer starken Verästelung der Zellen, normalerweise klare Identifikationskriterien für Pseudohyphen in *C. albicans* dar (Sudbery *et al.*, 2004). Da jedoch keine Verästelungen sichtbar waren und sich nur ein Teil der $\Delta eed1$ Zellen morphologisch von denen der Kontrollstämme unterschied, war eine klare Unterscheidung der Zellpopulation in Hyphen oder Pseudohyphen nicht möglich. Möglicherweise handelt es sich bei den Elongationen der $\Delta eed1$ Zellen aufgrund der modifizierten Regulation des Hyphenwachstums um morphologische Mischformen. Das Wachstum in der Pseudohyphenmorphologie wurde in *C. albicans* noch nicht tiefergehend untersucht, so dass erst sehr wenig über mögliche Regulations- oder Signaltransduktionswege bekannt ist und daher auch keine Rückschlüsse auf mögliche Überschneidungen bezüglich der verschiedenen Morphologien gezogen werden können.

4.4.3 Nicht-invasives Wachstum der $\Delta eed1$ Mutante auf Agar

Neben dem attenuierten Hyphenwachstum konnte für Zellen der $\Delta eed1$ Mutante auch kein invasives Wachstum auf Agar beobachtet werden. Während sich die Zellen des Wildtyps, des parentaler Stammes und der Retransformante durch invasives Hyphenwachstum in den untersuchten Festmedien ausbreiteten, zeigten die Hefezellen der $\Delta eed1$ Mutante kein invasives Wachstum auf den untersuchten Festmedien. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Abschnitt 4.1.2: Persistenz der Infektion), werden die invasiven Fähigkeiten von *C. albicans* vor allem mit der Hyphenform korreliert. Durch die apikale Ausdehnung der Hyphenzellen und dem damit verbundenen Druckaufbau sowie durch die Sezernierung bestimmter hydrolytischer Enzyme, können die Hyphenzellen aktiv in Oberflächen penetrieren und wachsen (Kumamoto and Vines, 2005a; Schaller *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2004; Bastmeyer *et al.*, 2002; Gow *et al.*, 2002). Es ist daher wahrscheinlich, dass

das defekte invasive Wachstum der Mutante auf die defekte Hyphenbildung der Zellen zurückzuführen ist. Da die Zellen der *Δeed1* Mutante unter keiner der untersuchten Bedingungen invasives Wachstum zeigten, bestätigen die gewonnenen Daten auch an dieser Stelle, dass die Mutante einen zentralen Defekt in der Hyphenbildung hat, der unter den meisten Bedingungen nicht kompensiert werden kann. Die Fähigkeit der Zellen invasiv wachsen zu können wurde in den verschiedenen Tropftestanalysen nach 2-4 Tagen Wachstum mikroskopisch untersucht. Ob die Zellen, der *Δeed1* Mutante daher auch bei der Interaktion mit den Festmedien eine transiente Elongation zeigten, wurde in diesen Untersuchungen nicht analysiert. Die mikroskopische Analyse der Festmedien zeigte für die *Δeed1* Mutante ausschließlich Hefezellen die sich durch abwaschen von der Oberfläche entfernen ließen. Akkumulationen innerhalb des Agars, die auf eine transiente Invasion rückschließen ließen, konnten nicht identifiziert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Expression von *EED1* auch für eine langfristige und stabile Hyphenbildung bei der Interaktion mit Agaroberflächen und dem damit verbundenen invasiven Wachstum essentiell ist.

4.4.4 Transiente Zellelongationen der *Δeed1* Mutante ermöglichen eine Invasion in orale Epithelzellen

Bei der Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe (RHE) verursachte die *Δeed1* Mutante kaum Gewebeschädigungen. Um die Kinetik der Interaktion der *Δeed1* Mutante mit oralen Epithelzellen und -gewebe zu determinieren, wurden sowohl orale Epithelzellen als auch das orale Epithelgewebe (RHE) mit der *Δeed1* Mutante infiziert und die Interaktion mikroskopisch über einen Zeitraum von 24 h analysiert. Die stündliche Analyse der Interaktion mit den oralen Epithelzellen zeigte, im Gegensatz zu dem Wachstum auf Agaroberflächen, eine transiente Elongation der Zellen der *Δeed1* Mutante. Die Zellen der *Δeed1* Mutante waren dabei morphologisch über einen Zeitraum von 7 h kaum von den Zellen der Kontrollstämme zu unterscheiden. Auch die Analyse der Interaktion der *Δeed1* Mutante mit dem oralen Epithelgewebe (RHE) zeigte während des frühen Zeitpunktes (1 h) elongierte Zellen. Diese interagierten mit dem Gewebe und induzierten die strukturellen Änderungen der epithelialen Oberflächen, wie sie für die Zellen des Wildtypes beschrieben worden waren (*membrane ruffling*,

induzierte Endozytose). Die transiente Elongation der *Δeed1* Zellen nach Kontakt zu den Epithelzellen und -gewebe untermauert die in den vorherigen Abschnitten diskutierte Postulation der Induktion des Hyphenwachstums durch verschiedene Stimuli. Der Kontakt zu epithelialen Oberflächen stellt in *C. albicans* einen besonderen Stimulus dar, der das Hyphenwachstum wahrscheinlich über die Stimulation verschiedener Signaltransduktionswege induziert. Dies wurde in verschiedenen Studien gezeigt, in denen avirulente und nicht filamentös wachsende Mutanten *in vitro* nach wie vor invasives Wachstum und Hyphenbildung bei der Interaktion mit epithelialen Oberflächen zeigten (Giusani *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 1999; Riggle *et al.*, 1999). Demnach implizieren die Ergebnisse, dass die Initiation der Hyphenbildung durch Kontakt zu epithelialen Oberflächen in *C. albicans* unabhängig von *EED1* reguliert werden kann.

Die mikroskopische Analyse der späteren Zeitpunkte (24 h) der Interaktion der *Δeed1* Mutante mit den Epithelzellen oder dem Epithelgewebe zeigte, dass die Hefezellen der Mutante vorwiegend intrazellulär in beulen- und traubenartigen Strukturen, in den oberen Schichten des RHE, vorlagen. Dies zeigt, dass auf Grund der transienten Elongation der Zellen auch ein transientes invasives Wachstum der *Δeed1* Mutante möglich gewesen sein muss. Die transiente Hyphenbildung der Zellen ermöglicht also induzierte Endozytose oder aktive Penetration in die Epithelzellen. Bedingt durch die lediglich transiente Elongation der Zellen fand die weiterführende Proliferation als Hefezellen intrazellulär statt, was die trauben- und beulenartigen Hefeakkumulationen erklärt. Demnach ist *C. albicans* auf die elongierte Hyphenform angewiesen um sich im Gewebe auszubreiten und um in tiefere Schichten vorzudringen. Die transiente Elongation ist *EED1* unabhängig und ermöglicht den Zellen eine lokal begrenzte Invasion, jedoch kein weiterführendes invasives Wachstum oder eine Ausbreitung im Gewebe. Als Folge der lokal stark begrenzten Ausbreitung sind die gemessenen Gewebeschädigungen gering.

4.4.5 Die *Δeed1* Mutante exprimiert hyphenspezifische Gene bei der Interaktion mit oralem Epithelgewebe

Auch bei der Interaktion mit oralem Epithelgewebe zeigte die *Δeed1* Mutante lediglich eine transiente Hyphenbildung. Interessanterweise spiegelte sich diese

Beobachtung nur ansatzweise in der Expression verschiedener hyphenassoziierter Gene wider. Einige der hyphenassozierten Gene wie z.B. *HWP1*, *RBT4* oder *SOD5* waren sowohl in dem parentalen Stamm als auch der Mutante über den gesamten Verlauf der experimentellen Infektion stark exprimiert. Lediglich die Gene *HYR1* und *ECE1* zeigten eine deutliche Repression in der Δ *eed1* Mutante über den Verlauf der experimentellen Infektion. Die starke Expression der hyphenassozierten Gene steht in direktem Widerspruch zu der beobachteten Hefemorphologie, da mit der transienten Hyphenmorphologie auch eine transiente Expression der hyphenassozierten Gene zu erwarten gewesen wäre. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten diskutiert, wird die Induktion der Hyphenmorphologie in *C. albicans* über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert. Für die meisten der hyphenassozierten Gene konnte neben einer generellen Efg1p abhängigen Regulation auch eine Regulation durch verschiedene andere Gene beobachtet werden (Kumamoto and Vines, 2005b). Das hyphenspezifische Oberflächenprotein Hwp1p zeigte eine verminderte Expression in der Δ *efg1* Mutante, jedoch eine normale Expression in der Δ *cph1* Mutante *in vitro* (Sharkey *et al.*, 1999). *In vivo* hingegen war die Expression von *HWP1* interessanterweise unabhängig von Efg1p (Lo *et al.*, 1997). Die Expression der hyphenassozierten Gene *SAP4-6* zeigte *in vitro* und *in vivo* eine gleichermaßen verminderte Expression in den Mutanten Δ *efg1* und Δ *cph1* (Korting *et al.*, 2003; Schröppel *et al.*, 2000). Bei den Genen *ECE1* und *HYR1* handelt es sich um hyphenspezifische Gene, deren Expression auch in den Mutanten Δ *efg1*, Δ *cph1* und Δ *cph2* in Lee's Medium vermindert war (Lane *et al.*, 2001b). In Serum war die Expression von *ECE1* indess unabhängig von Efg1p (Nantel *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu *HWP1* führt die Deletion der Gene *ECE1* und *HYR1* in *C. albicans* interessanterweise zu keinem hyphenassozierten Phänotyp (Bailey *et al.*, 1996; Birse *et al.*, 1993). Die variierende Expression der einzelnen hyphenassozierten Gene in den unterschiedlichen Mutanten impliziert eine komplexe und quervernetzte Regulation, welche es erschwert auf Grund der Expression einzelner Gene auf globalere Regulationsmechanismen rückzuschließen. Dass die Regulationsmechanismen der hyphenassozierten Gene weitaus komplexer sind als bisher angenommen, wurde auch in einer Studie von Zheng *et al.* gezeigt (Zheng *et al.*, 2004). Die in dieser Studie erstellte Δ *hgc1* Mutante, in welcher das G1-Cyclin Hgc1p ausgeschaltet wurde, zeigte sowohl *in*

vitro als auch *in vivo* keine Hyphenbildung, die hyphenspezifischen Gene *HWP1*, *ECE1* und *HYR1* waren in dieser Mutante jedoch unvermindert stark exprimiert. Ein ähnliches Phänomen wurde in dieser Arbeit für die Δ *eed1* Mutante beschrieben. Wie auch für die Δ *hgc1* Mutante muss gelten, dass die attenuierte Hyphenbildung in diesen Mutanten möglicherweise nicht einfach auf eine fehlregulierte Überexpression von Faktoren zurückzuführen ist, welche an der Repression des Hyphenwachstums beteiligt sind (z.B. Nrg1p), da Nrg1p die Expression hyphenassoziierter Gene in *C. albicans* nachweislich inhibiert (Murad *et al.*, 2001).

Hinsichtlich der Regulation der Morphogenese zeigte sich ein deutlicher Expressionsunterschied einzelner Gene zwischen den Transkriptionsprofilen der Δ *eed1* Mutante und dem parental Stamm. Komponenten des MAPK-Signalweges (*CPH1* und *CEK1*) zeigten zu den späten Zeitpunkten der experimentellen Infektion eine starke Expression in der Mutante, nicht jedoch in den Zellen des parental Stammes. Die Komponenten *CPH2* und *TEC1*, welche für unabhängige regulatorische Komponenten des Hyphenwachstums kodieren, waren hingegen in den Zellen des parental Stammes, jedoch nicht in der Mutante stark exprimiert. Für Gene anderer Signaltransduktionswege, wie z.B. der *RIM101* oder cAMP/PKA Signalwege konnten keine derartigen Expressionsunterschiede detektiert werden. Bei den regulatorischen Genen *CPH2* und *TEC1* konnte in verschiedenen anderen Studien eine medienabhängige Regulation einiger hyphenassoziierter Gene gezeigt werden (z.B. *SAP5*, *HYR1* oder *HWP1*) (Lane *et al.*, 2001a). Die Aktivierung der hyphenspezifischen Gene durch Cph2p erfolgte dabei immer über Tec1p, obwohl eine Überexpression von *TEC1* nicht zu einer Relativierung aller Δ *cph2* assoziierten Phänotypen führte (Lane *et al.*, 2001a). Die Stimuli, welche an der Expression von *CPH2* beteiligt sind, sind noch völlig unklar. Xu *et al.* postulierten anhand einer Studie mit Azol-resistenten *C. albicans* Stämmen, dass die verstärkte Expression von *CPH2* und *TEC1* für die stärkere Virulenz dieser Stämme verantwortlich ist (Xu *et al.*, 2006). Inwieweit dies generell zutreffend ist und ob eine schwache Expression von Cph2 möglicherweise an einer transienten Induktion der Hyphenbildung beteiligt ist, ist jedoch noch unklar.

Ob und in wie weit der interessante Phänotyp der *Δeed1* Mutante generell auf einer regulatorischen Dysfunktion basiert, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Interessanterweise spiegelt sich die im Vorfeld diskutierte mögliche Schlüsselrolle von Eed1p im MAP-Kinase Signalweg ansatzweise auch in den erstellten Transkriptionsprofilen wider, da Gene dieses Signalweges eine differentielle Expression in den Zellen der Mutante und des parental Stammes zeigten. Demnach ist eine regulatorische Funktion von Eed1p wahrscheinlich.

Zusammen mit der lediglich transienten Hyphenbildung der *Δeed1* Mutante bei der Interaktion mit dem oralen Epithelgewebe zeigte sich die Expression verschiedenerer Gengruppen im Vergleich zu dem parental Stamm stark verändert. In den Zellen der Mutante waren weder die an der NO[•]-Detoxifikation beteiligten Gene *SSU1* oder *YHB1*, noch die ein alkalisches pH-Milieu widerspiegelnden virulenz- oder stoffwechselassoziierten Gengruppen stark exprimiert. Stattdessen impliziert die starke Expression von *PHR2*, vor allem zu den späten Zeitpunkten der experimentellen RHE Infektion, ein eher saures Umgebungsmilieu. Die Ansäuerung des lokalen pH-Milieus könnte dabei auf die lokal begrenzte Interaktion der Hefezellen der *Δeed1* Mutante mit dem oralen Epithelgewebe zurückzuführen sein. Die ausschließlich transiente Hyphenbildung und die damit verbundene, kaum stattfindende Ausbreitung der Pilzzellen in dem Gewebe führten zu einer starken Akkumulation von Hefezellen in den oberflächennahen Bereichen des Gewebes. Da diese nach wie vor stoffwechselaktiv sind, wachsen und proliferieren, ist die Ansäuerung möglicherweise auf die starke Akkumulation ausgeschiedener Stoffwechselendprodukte zurückzuführen. Die nicht oder kaum detektierbare Expression der NO[•]-detoxifizierenden Gene lässt sich möglicherweise auf ähnliche Gründe zurückführen. Zum einen könnte die Hefeform der Zellen der *Δeed1* Mutante zu einer deutlich verringerten Induktion der NO[•]-Produktion führen, da diese, ähnlich wie die Zellen der monomorphen Hefe *S. cerevisiae*, nicht als pathogen „erkannt“ werden. Zum anderen könnten die Epithelzellen und die Bereiche des Gewebes, in denen die massenhafte Proliferation der Hefezellen stattfindet, bereits abgestorben sein. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Expressionsmuster ebenfalls direkt auf einen regulatorischen Defekt der *Δeed1* Mutante zurückzuführen sind.

4.4.6 Anmerkung zu den homozygoten und heterozygoten Stämmen der $\Delta eed1$ Mutante

Die Disruption eines Allels von *EED1* verursachte bereits eine signifikante Abschwächung des filamentösen Wachstums in den verschiedenen Medien sowie des invasiven Wachstums. Im Gegensatz zu den homozygoten Mutanten zeigten die heterozygoten Mutanten zwar teilweise elongierte Zellen und Pseudohyphenwachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen, dieses war jedoch ebenfalls nicht stabil. Auch die Untersuchung der heterozygoten Mutantenstämme im RHE-Modell zeigte interessanterweise ebenfalls eine starke Attenuierung der Virulenz dieser Stämme im Vergleich zu der Retransformante, dem parental Stamm und dem Wildtypstamm. Die Deletion beider Allele führte zwar zu einer weiteren Verstärkung des Phänotyps, die Daten implizieren jedoch, dass für eine vollständige Funktionalität von *EED1* beide Allele benötigt werden. Basierend auf diesem Hintergrund wurde der entsprechende Retransformationsstamm durch die Wiederherstellung zweier Allele in der heterozygoten Mutante rekonstruiert, was eine vollkommene Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotypes bewirkte. Interessanterweise zeigten die verschiedenen heterozygoten Mutanten (H1 und H2) leichte Abweichungen bezüglich ihrer Fähigkeit, Gewebeschädigungen im RHE Modell zu induzieren. Dies könnte zum einen auf sogenannte Markereffekte zurückzuführen sein, da die heterozygoten Mutanten genotypische Unterschiede aufweisen. Wie im Ergebnisteil beschrieben (Abschnitt 3.4.2.1: Konstruktion der Retransformationsplasmide und -stämme), wurde die heterozygote Mutante H2 (*eed1 Δ ::URA3/EED1*) als Zwischenschritt bei der Herstellung des Retransformationsstammes erstellt. Durch die Integration des Plasmides Clp30 (*URA3, HIS1, ARG4*) in den *RPS1* Locus trägt diese Mutante daher zwei Kopien des *URA3*-Gens. Im Gegensatz dazu exprimiert die heterozygote Mutante H1 (*eed1 Δ ::HIS1/EED1*) zwei Kopien des *HIS1*-Gens. Hinsichtlich der kritischen Rolle der ektopen und zu schwachen Expression von *URA3* für die Virulenz von *C. albicans*, könnte eine verstärkte Expression von *URA3* möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf das Virulenzverhalten von *C. albicans* mit sich ziehen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der unterschiedlichen Aktivität bzw. in einer unterschiedlichen Regulation der verschiedenen Allele. Eine *in silico* Analyse sowie verschiedene engmaschige

Testverdaus der genomischen DNA von *C. albicans* zeigten jedoch keinerlei sequenzielle Unterschiede auf DNA-Ebene. Interessanterweise sind die den ORF *EED1* flankierenden intergenen Regionen mit 3000 bp (upstream von *EED1*) und 4100 bp (downstream von *EED1*) ungewöhnlich lang. Möglicherweise könnten unterschiedliche regulatorische Komponenten in dem upstream Bereich eine differentielle Regulation der beiden Allele bewirken. Die Promotorbereiche von *EED1* konnten in dieser Arbeit jedoch nicht identifiziert werden, so dass an dieser Stelle keine Aussagen über mögliche Unterschiede hinsichtlich der Regulation der Allele gemacht werden können.

4.4.7 Strukturelle Ähnlichkeiten des Proteins Eed1p zu Proteinen aus anderen Organismen

Die strukturelle Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins Eed1p zeigte, dass es sich bei Eed1p um ein Protein mit einem sehr hohen Glutaminanteil handelte. 16% der Aminosäuren werden durch die Aminosäure Glutamin repräsentiert. Im Genom des verwandten Modellorganismus *S. cerevisiae* konnte ein orthologes Protein identifiziert werden, dessen Glutaminanteil vergleichbar hoch, bei 23% lag. Ähnlich wie bei Eed1p, konnten in Def1p in *in silico* Analysen bis auf zwei coil-coil Domänen keine weiteren strukturell konservierten Domänen oder Motive identifiziert werden.

In *S. cerevisiae* spielt Def1p eine wichtige Rolle bei der Regulation der RNA Polymerase II (RNAPII). Es handelt sich hierbei um einen Kofaktor, welcher im Falle einer irreparablen Schädigung des zu transkribierenden DNA Stranges für den Abbau der RNAPII durch Ubiquitylierung verantwortlich ist (RNAPII degradation factor 1) (Somesh *et al.*, 2005; Svejstrup, 2004; Woudstra *et al.*, 2002). Weiterhin konnte für Def1p eine Beteiligung an Telomere-assoziierten Reparaturmechanismen gezeigt werden (Chen *et al.*, 2005). Für *C. albicans* konnten keine, der in den $\Delta def1$ Stämmen identifizierten, mit DNA-Schädigungen assoziierten Phänotypen, identifiziert werden⁵. Dies könnte jedoch auch auf kompensatorische Effekte zurückzuführen sein, da Eed1p möglicherweise

⁵ Untersucht wurden in der $\Delta eed1$ Mutante Phänotypen assoziiert mit DNA-Reparaturmechanismen

ebenfalls einen Cofaktor oder einen Teil eines regulatorischen Komplexes darstellt. Der Prozess der Ubiquitylierung generell konnte jedoch auch schon auf anderen Ebenen mit der Regulation des Dimorphismus in *C. albicans* assoziiert werden. Der Ubiquitin-assoziierte Proteinabbau spielt vor allem bei der Regulation des Zellzyklus in *C. albicans* eine wichtige Rolle (Kornitzer and Ciechanover, 2000). So katalysiert die Ubiquitinligase möglicherweise den Abbau verschiedener Zykline und Zyklin-abhängiger Faktoren (Li *et al.*, 2006; Atir-Lande *et al.*, 2005). Eine wichtige Rolle spielen dabei die mit der Ubiquitinligase assoziierten Cofaktoren, welche für die Substratspezifität dieses Multikomplexproteins verantwortlich sind. Die Deletion einiger dieser Kofaktoren (Grr1p, Cdc4p) führte zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Morphogenese in *C. albicans* (Li *et al.*, 2006; Atir-Lande *et al.*, 2005).

Eine weitere Besonderheit der Proteine Eed1p und Def1p stellt der hohe Glutaminanteil in den Sequenzen dieser Proteine dar. Glutaminreiche Proteine spielen bei verschiedenen Prozessen wichtige und sehr verschiedene Rollen. Bei der neurodegenerativen Krankheit *Chorea huntington* z.B. führt ein krankhaft erhöhter Glutamingehalt des Genproduktes, das sog. „Huntingtin-Gen“ zum „Verkleben“ der Nervenzellen zu hochmolekularen Aggregaten und induziert schwere geistige und körperliche Behinderungen (Freiman and Tjian, 2002). Bei den neurodegenerativen Krankheiten Creuzfeld-Jakob und BSE (*Bovine Spongiforme Enzephalopathie*) handelt es sich um sogenannte Prionen-Erkrankungen, wobei es sich bei den Prionenproteinen ebenfalls um glutaminreiche Proteine handelt (Duennwald *et al.*, 2006). So genannte Gliadine, glutaminreiche Proteine, welche z.B. in Weizen vorkommen, spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allergien im Menschen (Westerberg *et al.*, 2006; Wieser, 1996). Auch auf regulatorischer Ebene spielen glutaminreiche Proteine eine wichtige Rolle. In *Arabidopsis thaliana* wurde ein glutaminreiches Protein (Grp23p) identifiziert, welches eine enge Interaktionen mit der RNAPII zeigte (Ding *et al.*, 2006). Des Weiteren sind die Aktivierungsdomänen einiger Transkriptionsfaktoren in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* durch eine starke Präsenz der Aminosäure Glutamin gekennzeichnet (Titz *et al.*, 2006; Remacle *et al.*, 1997).

Signifikante Ergebnisse verschiedener Blast Analysen des Eed1p Proteins aus *C. albicans* basierten weitestgehend auf Homologien zu den glutaminreichen Domänen der anderen Proteine. Darunter befanden sich z.B. die bereits erwähnten Proteine aus dem Weizen und *Arabidopsis thaliana* sowie Proteinen aus verschiedenen Pilzorganismen (*N. crassa*, *D. hansenii*, etc), deren putative Funktion mit nukleären Strukturen, Regulation und Transkription, regulatorischen Funktionen die RNAPII, sowie Komponenten von Histon-Acetyltransferasekomplexen assoziiert waren. Interessanterweise ist auch das für das Wachstum unter eingebetteten Bedingungen verantwortliche regulatorische Protein Czf1p charakterisiert durch einen kleineren, glutaminreichen Sequenzabschnitt (Vinces *et al.*, 2006). Ob und in wieweit Eed1p ebenfalls eine Rolle in den genannten Vorgängen spielt, kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Es wäre durchaus vorstellbar, das Eed1p an den Abbauprozessen möglicher, das Hyphenwachstum inhibierender Faktoren, beteiligt ist. Ein vergleichbarer Mechanismus konnte z.B. für Grr1p gezeigt werden, einem Cofaktor der Ubiquitinligase welcher an Abbauvorgängen bestimmter Zyklone in *C. albicans* beteiligt ist. $\Delta grr1$ Zellen waren charakterisiert durch konstitutives Pseudohyphenwachstum, möglicherweise induziert durch den fehlenden Abbau bestimmter, phasenspezifischer Zyklone (Butler *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). Interessanterweise konnte ein vergleichbarer Phänotyp auch für die $\Delta doa1$ Mutante in *C. albicans* gezeigt werden, deren Zellen ebenfalls durch konstitutives Pseudohyphenwachstum gekennzeichnet waren. Auch bei Doa1p handelt es sich um einen Cofaktor, welcher an ubiquitinabhängigen Proteinabbauprozessen beteiligt ist (Kunze *et al.*, 2007). Mechanistisch und regulatorisch ähnliche Vorgänge wären auch vorstellbar für ein „konstitutives“ Hefewachstum, so wie es bei der $\Delta eed1$ Mutante beobachtet wurde. Dies könnte möglicherweise durch inhibierte Abbauvorgänge wichtiger, das Hefewachstum inhibierender Faktoren induziert werden. Auch eine Beteiligung von Eed1p als regulatorischer Cofaktor der RNAPII, der an der Transkription bestimmter, für das Hyphenwachstum essentieller (regulatorischer) Faktoren, möglicherweise beteiligt ist, wäre vorstellbar. Die Initiation der Transkription sowie die Elongation des Transkriptionsprozesses ist ein hochkomplexer Mechanismus, an dem eine Vielzahl von Cofaktoren beteiligt ist. Diese determinieren die Spezifität der RNAPII, indem sie sowohl an der Erkennung bestimmter Promotoren beteiligt

sind, als auch die Aktivität der RNAPII auf Grund z.B. externer Stimuli, modulieren können (van den Boom *et al.*, 2002; Nikolov and Burley, 1997).

Wie bereits beschrieben, erfolgte die initiale Identifizierung von *EED1* als infektionassoziiertes Gen auf Grund der starken Expression zu den frühen und späten Zeitpunkten der experimentellen RHE Infektion. Dies könnte als Indiz gegen die Funktion des Gens als transkriptioneller Kofaktor, z.B. Transkriptionsfaktoren, gewertet werden, da derartige regulatorische Komponenten eher auf quantitativ niedrigem Niveau exprimiert werden. Weiterhin handelt es sich bei Eed1p um ein relativ großes Protein (Molekulargewicht ~100 kDa, 887 Aminosäuren). Dies würde ebenfalls gegen eine Beteiligung von Eed1p als transkriptioneller Cofaktor sprechen, da es sich bei derartigen Proteinen aus sterischen Gründen meist um kleinere Proteine handelt. Bei dem in *S. cerevisiae* identifizierten orthologen Protein Def1p handelt es sich jedoch um ein vergleichbar großes Protein (~81 kDa), so dass die Größe von Eed1p möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielt.

4.5 Weiterführende Arbeiten

Interaktion von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe

Als Basis für die vorliegende Studie diente das beschriebene RHE-Infektionsmodell. Eine interessante und anspruchsvolle Aufgabe wäre die Ausweitung des Modells zur Untersuchung von *C. albicans* als Kommensale. Hierzu müsste ein komplexes und interaktives System, welches bakterielle Bestandteile der Mikroflora sowie zelluläre und immunologische Abwehrmechanismen des Wirtes beinhaltet, entwickelt werden, was technisch eine große Herausforderung darstellen würde. Aus diesem Aspekt heraus wäre es daher experimentell einfacher das RHE-Modell mit nur einzelnen Komponenten „aufzurüsten“ (z.B. Speichel, zelluläre Komponenten des Immunsystems, antimikrobielle Peptide, Teile einer bakteriellen Mikroflora, etc.) oder zu modifizieren (veränderte Inkubationstemperaturen, verschiedenen pH-Werte, verschiedenen zellbiologische Inhibitoren, etc.), um die Interaktion zwischen Pilzzellen und Epithelgewebe unter diesen Bedingungen zu untersuchen, so wie es z.B. in ersten experimentellen Ansätzen mit neutrophilen Granulozyten von

Schaller *et al.* durchgeführt wurde (Schaller *et al.*, 2004). Mit der vorliegenden Studie wurden völlig neue Aspekte der direkten Interaktion von *C. albicans* mit Epithelgewebe beleuchtet, die es weiter zu untersuchen gilt. Hinsichtlich der weiterführenden Determinierung zellulärer Interaktionsmechanismen (induzierte Endozytose oder aktive Penetration) wäre die Untersuchung verschiedener oraler Gewebe mit unterschiedlich starker Verhornung interessant. Eine Auswertung dieser Proben könnte dann sowohl auf mikroskopischer (Elektronen- oder Fluoreszenzmikroskopie), zellulärer als auch auf molekularer Ebene durch Mikroarrayexperimente erfolgen.

Charakterisierung von *EED1*

Wichtigstes Ziel aller weiterführenden Arbeiten mit *EED1* sollte die Einordnung des Gens in den globalen Zusammenhang hyphen-regulatorischer Signaltransduktionswege in *C. albicans* sein. Dies könnte zum einen auf genetischer Ebene, über epistatische oder Überexpressions-Experimente erfolgen und ergänzend, proteinchemisch, über Lokalisationsversuche in der Zelle. Hinweise über die genaue Funktion von Eed1p könnten auch durch eine weiterführende Untersuchung des orthologen Proteins Def1p in *S. cerevisiae* gewonnen werden, möglicherweise durch die Expression von Def1p in *C. albicans* oder einer genaueren Analyse der glutaminreichen Regionen. Die vorliegenden Daten deuten zusammen mit anderen Studien an, dass die Rolle des Ubiquitinsystems bei der Morphologie und Virulenz von *C. albicans* bisher unterschätzt wurde. Daher gilt es, den Einfluss der Ubiquitylierung auf zelluläre Vorgänge in *C. albicans* zu untersuchen.