

## 4. Diskussion

Die Invasivität von *Candida albicans* ist ein bisher nur wenig untersuchtes Gebiet. Neben einigen Arbeiten zur Populationsgenetik von invasiven und nicht-invasiven *C. albicans* Stämmen (Dalle *et al.*, 2000; Luu *et al.*, 2001; Karahan *et al.*, 2004) haben bisher nur wenige Arbeiten direkt die Invasioneigenschaften von verschiedenen *C. albicans* Stämmen gegenüber Epithelzellen *in vitro* untersucht (Bartie *et al.*, 2004). Lediglich die Arbeiten von Kretschmar *et al.* haben direkt einen invasiven (SC5314) und einen nicht-invasiven (ATCC10231) Stamm *in vivo* verglichen (Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b).

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der invasive *C. albicans* Stamm SC5314 mit dem nicht-invasiven Stamm ATCC10231 auf phänotypischer sowie auf molekularer Ebene verglichen werden. Mit Hilfe von Transkriptionsanalysen sollte versucht werden, invasionsassoziierte Gene zu identifizieren. Ausgewählte Gene, die während einer Invasion exprimiert werden, sollten anschließend charakterisiert werden.

### 4.1 Die *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 zeigen nur geringe phänotypische und genotypische Unterschiede

#### 4.1.1 Phänotypische Unterschiede

Von den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 war bekannt, dass Stamm SC5314 virulent und invasiv ist, während Stamm ATCC10231 in allen bisher getesteten Modellen avirulent und nicht-invasiv ist (Balish und Phillips, 1966; Phillips und Balish, 1966; Schmidt und Geschke, 1996; Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b). Es lag somit die Vermutung nahe, dass die beiden Stämme sich auch in weiteren *in vitro* Bedingungen unterscheiden. Es zeigte sich jedoch, dass die beiden Stämme sich neben ihrem unterschiedlich schnellen Wachstum nur in sehr wenigen phänotypischen Punkten unterscheiden. Hierbei ist vor allem die im Vergleich zu Stamm SC5314 erhöhte Resistenz von Stamm ATCC10231 gegenüber Itraconazol und Ethanol zu nennen. Diese erhöhte Resistenz gegenüber zwei Reagenzien, die beide die Integrität der Zellmembran beeinflussen, könnte mit einem

erhöhten Ergosterolgehalt der Membran in Stamm ATCC10231 zusammenhängen. Die *in vivo* Transkriptionsprofile zeigten zumindest, dass Stamm ATCC10231 während der intraperitonealen Infektion der Maus verstärkt Gene des Ergosterolbiosynthesewegs exprimiert (s.u.). Zumindest für Azole konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression dieser Gene, insbesondere von *ERG11*, zu einer erhöhten Resistenz führt (Lupetti *et al.*, 2002). Auch gegenüber 5-Fluoroorotsäure (5-FOA) wurde eine erhöhte Resistenz in Stamm ATCC10231 beobachtet. Normalerweise wird 5-FOA als Selektionsmarker bei Transformationen von *C. albicans* verwendet (Fonzi und Irwin, 1993). Es sollten daher nur Stämme wachsen können, bei denen das *URA3*-Gen fehlt bzw. nicht mehr intakt ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von 5-FOA zu chromosomalen Änderungen in *C. albicans* kommen kann, die eine Resistenz verursachen, obwohl die resultierenden Stämme noch ein intaktes *URA3*-Gen aufweisen (Wellington und Rustchenko, 2005). Da Stamm ATCC10231 auf chromosomaler Ebene nicht identisch mit SC5314 ist (pers. Mitteilung B. B. Magee), könnte hier auch ein Zusammenhang zwischen dem Karyogramm und der Resistenz bestehen. Den genauen Mechanismus für die Resistenz kennt man allerdings noch nicht. Daneben könnte auch eine verstärkte Expression von Effluxtransportern (Prasad und Kapoor, 2005) oder ähnlich wie bei der verwandten Komponente 5-Flucytosin eine Mutation in dem Zielprotein (Dodgson *et al.*, 2004) zu einer erhöhten Resistenz beitragen. Für 5-FOA ist jedoch ein solcher Mechanismus bisher nicht beschrieben worden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Stämmen SC5314 und ATCC10231 ergab sich auf Komplexmedium, dem Glukose oder eine andere fermentierbare Kohlenstoffquelle fehlt. Ähnlich wie *S. cerevisiae* (Cullen und Sprague, 2000) ist auch *C. albicans* (SC5314) auf einem solchen Medium invasiv. Stamm ATCC10231 war hingegen nicht in der Lage in die Agaroberfläche einzudringen. Da bei *S. cerevisiae* Kontrollgene des Glukosemetabolismus eine entscheidende Rolle bei der Invasion in glukosearmes Medium spielen (Cullen und Sprague, 2000), könnte für *C. albicans* ähnliches gelten und somit könnte in Stamm ATCC10231 dieser Kontrollmechanismus beeinträchtigt sein. In dem Maispathogen *Cochliobolus carbonum* konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Expression glukoseregulierter Gene und der Virulenz beobachtet werden (Tonukari *et al.*, 2000). Obwohl es keine direkten Hinweise gibt, könnte es auch sein, dass der Glukose-

Sensor Hgt4 (Brown *et al.*, 2006) in Stamm ATCC10231 ähnlich wie der pH-Sensor Dfg16 (s.u.) unter glukosearmen Bedingungen nicht exprimiert wird oder einen Defekt aufweist. Beide Aspekte würden möglicherweise auch die Avirulenz von Stamm ATCC10231 erklären.

Wie oben bereits erwähnt, war ein phänotypischer Unterschied zwischen den beiden Stämmen das verlangsamte Wachstum von Stamm ATCC10231 im Vergleich zu SC5314. Dieser Unterschied sollte anhand von Transkriptionsprofilen der beiden Stämme in SD-Medium näher charakterisiert werden. Auffällig war dabei, dass Stamm ATCC10231 vor allem stressassoziierte Gene stärker exprimiert als Stamm SC5314. Also scheint bereits das Wachstum in definiertem Medium, in dem aber alle nötigen Nährstoffe enthalten sind, eine Stresssituation für Stamm ATCC10231 darzustellen. Interessanterweise war auch das für die Ammoniumpermease kodierende Gen *MEP2* stärker in Stamm ATCC10231 exprimiert als in Stamm SC5314. Da Ammonium im SD-Medium die einzige Stickstoffquelle darstellt und da der Stickstoffmetabolismus während einer Infektion für eine volle Virulenz essentiell zu sein scheint (Martinez und Ljungdahl, 2004), lag die Vermutung nahe, dass Stamm ATCC10231 eventuell einen Defekt im Stickstoffmetabolismus aufweist. Die Ammoniumaufnahme war in beiden Stämmen jedoch identisch und auch der Austausch der Stickstoffquelle zeigte keine Angleichung in der Wachstumsrate der beiden Stämme. Somit ist zu vermuten, ob eventuell der gesamte Metabolismus in Stamm ATCC10231 langsamer läuft als in Stamm SC5314. So könnte in *C. albicans* ein verlangsamter Metabolismus einen Einfluss auf die Virulenz haben, so dass langsam wachsende Stämme weniger virulent sind als schnell wachsende. Dass die Wachstumsgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Virulenz haben kann, wurde zumindest schon für Mykobakterien gezeigt (Lewin und Sharbati-Tehrani, 2005). Hierbei verhält es sich allerdings so, dass die langsam wachsenden Arten virulenter als die schnell wachsenden Arten sind. Es ist aber hierbei zu beachten, dass das langsame Wachstum der hoch virulenten Mykobakterien vor allem wohl einen Vorteil bei der Persistenz im Körper bietet (Lewin und Sharbati-Tehrani, 2005). *C. albicans* muss im Gegensatz dazu eher schnell wachsen, um einen Vorteil gegenüber anderen Mikroorganismen in der mikrobiellen Flora des Menschen zu erhalten.

Neben diesen Untersuchungen unter definierten Bedingungen, wurden auch die Interaktionen der beiden Stämme mit Wirtszellen bzw. Wirtskomponenten untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass die Adhäsion an Fibroblasten (3T3) in beiden Stämme nahezu identisch war. Da die Adhäsion ein entscheidender Schritt für eine erfolgreiche Invasion ist (Bernhardt *et al.*, 2001), scheint eine unterschiedliche Adhäsion keine Rolle bei der Invasivität und Virulenz der beiden Stämme während einer intraperitonealen Infektion zu spielen. Im Gegensatz dazu war die Adhäsion von Stamm ATCC10231 an Epithelzellen (HEp-2) gegenüber Stamm SC5314 leicht erhöht. Wie die Arbeit von Albrecht *et al.* zeigte, kann eine verstärkte Adhäsion mit einer abgeschwächten Virulenz einhergehen (Albrecht *et al.*, 2006). Dies könnte auch erklären, warum Stamm ATCC10231 in rekonstituiertem humanen Epithel (RHE) nicht-invasiv war. Obwohl über Tropftests die Aktivität extrazellulärer Proteasen und Phospholipasen/Lipasen nachgewiesen werden konnte und Stamm ATCC10231 die oberflächlichen Epithelzellen lysieren konnte, wurden dennoch keine invasiven Hyphen im RHE-Modell beobachtet. Auch in diesem Modell zeigte sich also der nicht-invasive Charakter von Stamm ATCC10231.

Der nicht-invasive Charakter von Stamm ATCC10231 wurde weiterhin im Matrigel-Invasionsassay sichtbar. Hier zeigte sich zusätzlich, dass Stamm ATCC10231 im Gegensatz zu Stamm SC5314 nur sehr kurze Hyphen ausbildete. Wie die Analyse der  $\Delta dfg16$  Mutante zeigte (s. u.), spielt auch hierbei vermutlich der pH-Wert des verwendeten Mediums (DMEM; pH 8) eine große Rolle. Da Stamm ATCC10231, vermutlich ähnlich wie die  $\Delta dfg16$  Mutante, nicht in der Lage war, den alkalischen pH-Wert richtig zu erkennen (siehe auch Transkriptomanalyse von ATCC10231 weiter unten), wurden Hyphen nur in sehr geringem Maße ausgebildet. Der Kontakt zu den Proteinen des Matrigels scheint dabei kein ausreichender Stimulus zu sein, um eine kontaktbedingte Hyphenbildung (Kumamoto, 2005) zu induzieren.

Ein interessanter Aspekt ergab sich bei der Interaktion der beiden Stämme mit Makrophagen. Obwohl die Adhäsion und/oder Phagozytose durch Makrophagen von Stamm ATCC10231 niedriger war als von Stamm SC5314, so hatten im Verhältnis mehr Zellen von Stamm ATCC10231 als von Stamm SC5314 den Kontakt mit den Makrophagen überlebt. Die relative Resistenz von Stamm ATCC10231 gegenüber Makrophagen würde erklären, warum der Stamm nach einer intraperitonealen Infektion der Maus nicht in der Bauchhöhle von dort ansässigen Makrophagen eliminiert wird, sondern trotz seiner nicht vorhandenen Invasivität ins Blut gelangt, und somit auch sekundär im Herz, der Lunge oder den Nieren gefunden werden konnte (Kretschmar *et al.*, 1999a). Da Stamm ATCC10231 nicht im ZNS gefunden

wurde (Kretschmar *et al.*, 1999a), stellt sich aber die Frage, ob die Invasivität benötigt wird, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Jong *et al.* konnten bereits zeigen, dass *C. albicans* zumindest *in vitro* in der Lage ist, Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Jong *et al.*, 2001).

#### 4.1.2 Genotypische Unterschiede

Es war bereits bekannt, dass sich die beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 auf genomischer Ebene unterscheiden. Dazu gehören zum Einen die unterschiedlichen Elektrokaryogramme (pers. Mitteilung B. B. Magee) und zum Anderen konnte mittels *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) gezeigt werden, dass die beiden Stämme in unterschiedlichen Gruppen liegen (SC5314: Gruppe 1; ATCC10231: Gruppe 2) (Tavanti *et al.*, 2005). Weiterhin ist bekannt, dass die Genome verschiedener *C. albicans* Stämme generell hoch variabel sind (Magee und Chibana, 2002) und somit auch bisher nur wenige Korrelationen zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp eines Isolats gefunden wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Stämme, SC5314 und ATCC10231, heterozygot in Bezug auf den Paarungstyp sind. Somit konnte für Stamm ATCC10231 kein Zusammenhang zwischen einem homozygoten Paarungstyp und der beobachteten Itraconazol-Resistenz hergestellt werden, wie er bereits bei anderen Stämmen gefunden wurde (Rustad *et al.*, 2002). Es besteht auch keine Korrelation zwischen dem Paarungstyp und der beobachteten Virulenz der beiden Stämme wie es Lockhart *et al.* für andere Stämme bereits beschrieben haben (Lockhart *et al.*, 2005). Da ein Zusammenhang zwischen Paarungstyp und Virulenz nicht unumstritten ist (Ibrahim *et al.*, 2005), sollten die beiden hier untersuchten Stämme in Zukunft zusätzlich auf ihre Ploidität hin untersucht werden, da es Anzeichen dafür gibt, dass die Ploidität im Zusammenhang mit der Virulenz stehen könnte (Ibrahim *et al.*, 2005).

Bezüglich der unterschiedlichen Invasivität von verschiedenen *C. albicans* Stämmen wurde in einer populationsgenetischen Studie postuliert, dass der Genotyp mit der Invasivität korreliert (Karahan *et al.*, 2004). Die beiden Stämme SC5314 und ATCC10231 zeigten in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse des 25S-Introns beide den Genotyp A. Somit sind beide Stämme zu den invasiven Isolaten zu zählen. Aber auch bei dieser Analyseverfahren ist Vorsicht geboten, da andere Arbeiten mit

anderen Methoden keinen Zusammenhang zwischen der Invasivität und dem Genotyp feststellen konnten (Luu *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten kamen ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen (Odds *et al.*, 1983; Dalle *et al.*, 2000), so dass man von einem gefundenen Genotyp oder Phänotyp nicht zwangsläufig auf die Invasionseigenschaft eines *C. albicans* Stamms rückschließen kann.

Eine vergleichende Genomhybridisierung (CGH) der beiden Stämme bestätigte das beschriebene Bild. Bei der genetischen Analyse von Pathogenen ist die vergleichende Genomhybridisierung mit Hilfe von Microarrays ein nützliches Werkzeug, um Gene zu identifizieren, die in dem verwendeten Referenzstamm (von dem die Microarrays produziert worden sind) und dem zu testenden Stamm vorhanden sind oder um Gene zu identifizieren, die in dem Referenzstamm vorhanden sind aber nicht im Teststamm (Zhang und Zhang, 2006). Vor allem bei der Analyse von pathogenen und apathogenen Bakterienstämmen hat sich diese Methode bewährt (Schoolnik, 2002). Auch für die Bestimmung der Existenz und Divergenz von Genen aus *C. dubliniensis* im Vergleich zu *C. albicans* wurden Microarray-basierte vergleichende Genomhybridisierungen erfolgreich eingesetzt (Moran *et al.*, 2004).

Entsprechend der Arbeit von Moran *et al.* (Moran *et al.*, 2004) wurden in dieser Arbeit die beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 einer vergleichenden Genomhybridisierung unterzogen. Dabei zeigte sich, dass Stamm ATCC10231 alle Gene besitzt, die auch in Stamm SC5314 vorkommen, so dass das Fehlen eines Gens nicht die unterschiedlichen Eigenschaften von Stamm ATCC10231 im Vergleich zu Stamm SC5314 erklären kann. Dies steht im Gegensatz zu einer Arbeit, bei der unterschiedliche *S. cerevisiae* Stämme mittels CGH verglichen wurden und bei der 25 Gene in dem Teststamm im Vergleich zum Referenzstamm nicht vorhanden waren (Daran-Lapujade *et al.*, 2003). Die fehlende Detektion dieser Gene könnte allerdings damit zusammenhängen, dass für die *S. cerevisiae* CGH Microarrays mit kurzen Oligomeren (25mer) eingesetzt wurden und somit einzelne Basenaustausche bereits zum Nicht-Hybridisieren geführt haben könnten. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Microarrays wurden PCR-Produkte von ca. 300 bp Länge auf die Glasoberfläche appliziert, so dass einzelne Basenaustausche nur einen geringen Einfluss auf die Hybridisierungsstärke hatten.

Dieser Aspekt zeigte sich auch bei der Analyse der schwach hybridisierenden Gene aus Stamm ATCC10231. Wie sich zeigte, gab es keine Korrelation zwischen der Hybridisierungsstärke und der Sequenzhomologie zu Stamm SC5314. So konnte unter 42 unterschiedlich stark hybridisierenden Genen nur für drei Gene (*PHO81*, *HAL21* (=MET223), *HAL22* (=MET221)) ein signifikanter Unterschied in der Sequenz zwischen Stamm SC5314 und Stamm ATCC10231 gefunden werden. Da bisher allerdings kein Phänotyp von Stamm ATCC10231 mit einem dieser Gene in Verbindung gebracht werden konnte, ist fraglich, ob die Basenaustausche einen Einfluss auf die Funktion der kodierten Proteine haben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei anderen Genen Nukleotidaustausche, die nicht durch die CGH erkannt wurden, zu Funktionsbeeinträchtigungen des kodierten Proteins führen können. Ausserdem können Unterschiede in den intergenischen Regionen, welche durch die CGH nicht detektiert werden können, zu unterschiedlichen Transkriptionsprofilen einzelner Gene führen.

Interessanterweise kodieren elf der untersuchten schwach hybridisierenden Genabschnitte für Proteine eines Retrotransposons. Da bei *C. albicans* ein aktives Retrotransposon nachgewiesen werden konnte (Holton *et al.*, 2001), lässt sich spekulieren, ob die Unterschiede in der Hybridisierung mit unterschiedlichen Anzahlen und/oder Positionen der Retrotransposone innerhalb der beiden Genome zusammenhängen. Da bei der Vorbereitung für die CGH die DNA enzymatisch geschnitten wurde, könnten durch unterschiedliche Positionen der Retrotransposone unterschiedlich lange Fragmente bei den Genomen der beiden Stämme entstanden sein, welche die Hybridisierung beeinträchtigten. Allerdings wurde auch bei der CGH zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* ein relativ hoher Anteil an Retrotransposon-Elementen gefunden, die unterschiedlich hybridisierten (Moran *et al.*, 2004). Die Autoren spekulierten, dass nach der evolutionären Divergenz von *C. albicans* und *C. dubliniensis* unterschiedliche Retrotransposone akquiriert wurden (Moran *et al.*, 2004). Da aber die beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 ähnliche Unterschiede zeigten, scheint eine unterschiedliche Hybridisierung durch unterschiedliche Anzahl und/oder Positionen im Genom wahrscheinlicher.

Neben den schwach hybridisierenden Genabschnitten von Stamm ATCC10231 gab es auch Abschnitte, die ein stärkeres Signal mit DNA von Stamm ATCC10231 als mit DNA von Stamm SC5314 zeigten. Solche stärker hybridisierenden Gene wurden auch bei den CGH-Studien mit *S. cerevisiae* und *C. dubliniensis* gefunden (Daran-

Lapujade *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2004) und könnten durch Kreuzhybridisierungen paraloger Gene aus Stamm ATCC10231 oder durch eine erhöhte Genkopienzahl bzw. Unterschiede in der Ploidität der beiden Stämme erklärt werden.

Die Analyse verschiedener Patientenisolat von *C. albicans* deuteten weiterhin an, dass Unterschiede im Gengehalt verschiedener Isolate nur sehr gering sind. Trotz der Heterogenität der Genome auf physikalischer Ebene wie z.B. bei Elektrokaryogrammen (Magee und Chibana, 2002), scheint die Genanzahl in den einzelnen Isolaten sehr konstant zu sein. Erklärbar wäre dieses Phänomen mit den überwiegend klonalen *C. albicans* Populationen, bei denen Rekombinationen generell nur selten vorkommen (Gräser *et al.*, 1996) bzw. bei denen sexuelle Rekombinationen sehr seltene Ereignisse sind (Bennett und Johnson, 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 bisher nur wenige, aber sehr distinkte phänotypische und genotypische Unterschiede gefunden wurden. Die genotypischen Unterschiede liefern jedoch keine Erklärung für die unterschiedliche Invasivität der beiden Stämme, so dass die Differenzen – wie bereits oben angedeutet - eher auf transkriptioneller Ebene zu suchen sind.

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

Weitere Untersuchungen zu den Invasionseigenschaften der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 basierten auf der Analyse von *in vivo* Transkriptionsprofilen. Da die intraperitoneale Infektion der Maus (Kretschmar *et al.*, 1999a; Kretschmar *et al.*, 1999b) einen Tierversuch darstellt und da die Menge an gewonnenem Pilzmaterial nach einer Infektion extrem gering ist, sollte versucht werden, ein Invasionsmodell zu etablieren, welches der *in vivo* Situation möglichst ähnlich ist. Daten aus diesem Modell sollten so die *in vivo* Daten ergänzen.

Ein Modell, welches die *in vivo* Situation einer intraperitonealen Infektion gut imitiert ist die *ex vivo* perfundierte Leber. Extrakorporale Leberperfusionen wurden unter anderem schon erfolgreich für Studien zur Lebertoxizität von Agenzien eingesetzt (Groneberg *et al.*, 2002) und können auf einen Perfusionszeitraum von bis zu 72

Stunden ausgedehnt werden (Butler *et al.*, 2002). Weitere Arbeiten verwendeten perfundierte Lebern *in situ*, um die Interaktion von *C. albicans* Zellen mit der Leber zu untersuchen (Sawyer *et al.*, 1976; Schwocho und Moon, 1981; Sawyer, 1988; Sawyer *et al.*, 1990). Bei diesen Arbeiten wurde eine intravenöse Infektion durchgeführt. Invasioneigenschaften wurden nicht untersucht. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Grosse-Siestrup von den tierexperimentellen Einrichtungen der Charité (Campus Virchow-Klinikum, Berlin) das Modell einer perfundierten Schweineleber etabliert, bei der durch die Applikation von *Candida*-Zellen auf die Organoberfläche die Invasion histologisch und auf transkriptioneller Ebene verfolgt werden konnte (Thewes *et al.*, 2007).

#### 4.2.1 Aufbau des Modells und allgemeine Perfusionsparameter

Mit einem einfachen Aufbau, der nur eine allgemeine medizinische Ausstattung voraussetzte, konnte die Leber bis zu 12 Stunden erfolgreich perfundiert werden ohne dass größere Läsionen im Lebergewebe entstanden. Die funktionellen Parameter zeigten, dass die Leber während dieser 12 Stunden konstant Galle produzierte und Sauerstoff verbrauchte. Da auch die Gewichtszunahme, die durch kleinere Ödeme im Lebergewebe erklärbar ist (Nagel *et al.*, 2005), nur moderat war, war das hier vorgestellte Modell vergleichbar mit anderen *ex vivo* Perfusionen der Leber (Butler *et al.*, 2002; Grosse-Siestrup *et al.*, 2002b; Nagel *et al.*, 2005).

Neben den Funktionsparametern wurden durch die Bestimmung der Aspartataminotransferase- (AST) und Alaninaminotransferase- (ALT) Konzentrationen im Perfusionsblut auch Werte bestimmt, die eine Schädigung der Leber erkennen lassen (Giannini *et al.*, 2005). Während bei der ALT-Konzentration kein signifikanter Anstieg innerhalb der ersten drei Stunden zu erkennen war, zeigte die AST-Konzentration einen stetigen Anstieg über die ersten drei Perfusionsstunden. Dieser Anstieg kann wie die Gewichtszunahme auf post-ischämische Schäden hindeuten (Nagel *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte bei den ALT- und AST-Werten kein Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Organen ausgemacht werden. Dies zeigte, dass auch bei der *ex vivo* perfundierten Leber der Organschaden zu den frühen Infektionszeitpunkten durch die Pilzzellen zu vernachlässigen ist. Dies stand im Einklang mit den Ergebnissen einer intraperitonealen Infektion der Maus. Auch hier konnten erhöhte

Enzymkonzentrationen erst zu späteren Zeitpunkten im Blut detektiert werden (Kretschmar *et al.*, 1999a).

#### 4.2.2 Stamm ATCC10231 ist auf der perfundierten Leber nicht-invasiv

Da die *ex vivo* perfundierte Leber als Ergänzung zur intraperitonealen Infektion der Maus genutzt werden sollte, wurde die Leber mit den beiden *C. albicans* Stämmen SC5314 und ATCC10231 infiziert. Hierbei zeigte sich, dass Stamm ATCC10231 während der 12 Stunden-Perfusion nicht in der Lage war in die Leber einzudringen. Also war dieser Stamm wie bei der intraperitonealen Infektion der Maus (Kretschmar *et al.*, 1999b) und dem Matrigel-Assay (siehe Abschnitt 4.1.1) nicht-invasiv.

Stamm SC5314 hingegen konnte ca. 7 Stunden nach Beginn der Infektion die Leberkapsel durchdringen und erreichte 10 Stunden nach Beginn der Infektion auch tiefer gelegene Hepatozyten. Im Vergleich zur intraperitonealen Infektion der Maus war die Invasion um ca. 2-4 Stunden verzögert (Kretschmar *et al.*, 1999a; Felk *et al.*, 2002). Ein möglicher Grund für diese Verzögerung wäre die im Verhältnis zur Maus dickere Organkapsel der Schweineleber.

Da die *ex vivo* perfundierte Leber das naheste Modell im Vergleich zur *in vivo* Situation darstellt (Groneberg *et al.*, 2002) und da die histologischen Bilder der Invasion im *ex vivo* Modell große Ähnlichkeit zu den *in vivo* Untersuchungen hatte, konnten infizierte Leberproben erfolgreich für Transkriptionsanalysen verwendet werden und somit die Analyse der *in vivo* Proben ergänzen. Weitere Vorteile der *ex vivo* perfundierten Schweineleber sind ihre große Oberfläche, die es erlaubt mehrere Proben auf einem Organ zu untersuchen, und die Tatsache, dass perfundierte Organe kein Tierexperiment darstellen. Dieses Modell ist vielmehr eine Organentnahme zu Versuchszwecken und trägt somit auch zum „3R“-Konzept (*Reduction, Refinement, Replacement*) für tierexperimentelle Arbeiten bei (Grosse-Siestrup *et al.*, 2002a; Grosse-Siestrup *et al.*, 2002b).

## 4.3 Die *in vivo* und *ex vivo* Transkriptionsprofile sind phasen- und stammspezifisch

### 4.3.1 Experimentelles Design

Genomweite Expressionsprofile von Mikroorganismen während einer Infektion liefern wertvolle Informationen über die Interaktion zwischen dem Mikroorganismus und seiner Umgebung im Wirt (Hinton *et al.*, 2004). Da die Analyse der *in vivo* Transkriptionsprofile von Mikroorganismen verschiedene technische Probleme aufweist, gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die die Expressionsprofile von Mikroorganismen innerhalb eines Wirts untersucht haben (Hinton *et al.*, 2004). Eine einzige Arbeit von Andes *et al.* hat bisher das Transkriptionsprofil von *C. albicans* in infizierten Mäusenieren analysiert (Andes *et al.*, 2005). Dabei wurde jedoch lediglich ein Pool aus verschiedenen infizierten Organen zu nur einem Zeitpunkt mit Laborkulturen verglichen.

In den meisten bisherigen *in vivo* Transkriptomanalysen mit Microarrays wurden Mikroorganismen durch differentielle Lyseansätze von den Wirtszellen physikalisch getrennt. Da aber bekannt ist, dass Mikroorganismen ihr Transkriptionsprofil innerhalb von Minuten auf eine neue Umgebung anpassen können, könnten differentielle Lyseansätze das Transkriptionsprofil verfälschen (Hinton *et al.*, 2004). Für *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit mancher mRNA-Moleküle weniger als 5 min beträgt (Kebaara *et al.*, 2006), so dass bei längeren Lyseansätzen die Gefahr besteht, dass die mRNA degradiert. Weiterhin kann durch das Vereinigen von mehreren infizierten Organen (Andes *et al.*, 2005) das Transkriptionsprofil stark geglättet werden. Aus diesen genannten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit auf differentielle Lyseansätze verzichtet und es wurden einzelne *C. albicans* Proben zu bestimmten Zeitpunkten der Infektion zusammen mit dem Wirtsgewebe aufgearbeitet. Um dennoch an genügend mRNA zu gelangen wurden die Proben nicht vereinigt, sondern jede Probe wurde einzeln linear *in vitro* durch die T7 RNA-Polymerase amplifiziert (Van Gelder *et al.*, 1990). Diese Methode wurde in verschiedenen Arbeiten evaluiert und zeigte sich als robuste Methode, um RNA ohne Verzerrungen zu amplifizieren (Wang *et al.*, 2000; Pabon *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004).

Mit Hilfe dieses technischen Protokolls konnten der invasive *C. albicans* Stamm SC5314 und der nicht-invasive Stamm ATCC10231 direkt aus Leberproben heraus analysiert werden. Durch die Verwendung einer Referenz-RNA, konnten die einzelnen Transkriptionsprofile der *in vivo* und *ex vivo* Infektion auf einfache Weise miteinander verglichen werden (Novoradovskaya *et al.*, 2004).

#### 4.3.2 Phasen- und stammspezifische Genexpression

Das oben beschriebene experimentelle Design erlaubte es weiterhin, Zellen zu untersuchen, die sich alle in einem ähnlichen Stadium der Infektion befanden, ähnlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren und auf ähnliche Art und Weise mit dem Wirt interagierten. Dennoch musste davon ausgegangen werden, dass zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche Zellpopulationen vorlagen und somit auch überlappende Transkriptionsprofile detektiert wurden. So lagen zu den späteren Infektionszeitpunkten Zellen vor, die sich auf der Leberoberfläche befanden und gleichzeitig Zellen, die tief in das Lebergewebe eingedrungen waren. Hierarchisches Clustern der unterschiedlichen *in vivo* Transkriptionsprofile zeigte aber deutlich die Unterschiede zwischen dem invasiven Stamm SC5314 und dem nicht-invasiven Stamm ATCC10231. So waren zu Beginn der Infektion die Profile beider Stämme noch recht ähnlich, die Expressionsprofile unterschieden sich allerdings zu den späteren Zeitpunkten als bei Stamm SC5314 eine neue Zellpopulation in Erscheinung trat. Diese neue Zellpopulation waren die Hyphen, die die Leberkapsel durchbrochen hatten und mit den Hepatozyten interagierten.

Die *ex vivo* Transkriptionsprofile zeigten nicht so ein deutliches Bild wie die *in vivo* Profile. Dies lag daran, dass der Infektionsverlauf auf der perfundierten Leber in einigen Bereichen Unterschiede zu dem Verlauf der intraperitonealen Infektion der Maus aufwies. Dies spiegelte sich darin wider, dass nur das 12 h *ex vivo* Profil größere Ähnlichkeiten zu den Profilen der invasiven *in vivo* Zeitpunkte 3 h und 5 h hatte. Aus diesem Ergebnis kann man jedoch folgern, dass die Genexpression gerade dieser drei Zeitpunkte (3 h und 5 h *in vivo*; 12 h *ex vivo*) den biologischen Vorgang der Invasion von Lebergewebe durch *C. albicans* Zellen widerspiegelt.

### 4.3.3 Die Transkriptionsprofile reflektieren metabolische und morphologische Eigenschaften von *C. albicans* während der Infektion

#### 4.3.3.1 Metabolismus, Stress und Nährstoffe

Die Adaption von *C. albicans* an eine neue Umgebung verläuft sehr schnell und kann die Hochregulation des gesamten Protein-Metabolismus (z.B. tRNA-Synthetasen (Fradin *et al.*, 2003)) erfordern. Gene, die generell als Antwort auf die Umgebung der Bauchhöhle nach einer intraperitonealen Infektion exprimiert werden, umfassen solche Gene, die sowohl zu den frühen, als auch zu den späten Infektionszeitpunkten exprimiert werden. Dazu gehörten bei Stamm SC5314 z.B. die metabolischen Gene der Glykolyse, der Acetyl-CoA-Biosynthese und des Tricarbonsäurezyklus (*PFK2*, *PDA1*, *PDX1*, *KGD1* und *KGD2*), welche alle zu allen drei Zeitpunkten *in vivo* hochreguliert waren. Dies würde bedeuten, dass während der Infektion C<sub>6</sub>-Zucker über die Glykolyse metabolisiert werden und dass die benötigte Energie durch die Produktion von NADH<sub>2</sub> im Tricarbonsäurezyklus (Atmung) produziert wird. Dennoch schienen einige Zellen nicht ausreichend Glukose zur Verfügung zu haben, da neben glykolytischen Genen auch *PCK1*, das Gen welches für das Schlüsselenzym der Glukoneogenese, die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, kodiert, auch hochreguliert wurde. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Arbeit von Barelle *et al.*, die zeigen konnte, dass *C. albicans* ein metabolisches Programm mit aktivierter Glykolyse und Glukoneogenese zu verschiedenen Zeitpunkten einer systemischen Infektion abrufen (Barelle *et al.*, 2006). In den hier vorliegenden Transkriptionsprofilen überlappen diese Programme vermutlich auf transkriptioneller Ebene. Dies würde auch erklären, warum neben Genen des Tricarbonsäurezyklus auch Gene hochreguliert waren, die anaerobes Wachstum andeuteten (*GAL10*, *AGP1*).

Stamm ATCC10231 zeigte interessanterweise keine Hochregulierung glykolytischer Gene. Im Gegensatz dazu waren Gene hochreguliert, die für Enzyme des Glyoxylatzyklus kodieren (*ICL1*, *CIT1*, *MDH11*, *ACS1*). Diese Gene werden in Zellen hochreguliert, die von Neutrophilen oder Makrophagen phagozytiert worden sind oder sich in einer glukosearmen Umgebung befinden (Lorenz und Fink, 2001; Lorenz *et al.*, 2004; Fradin *et al.*, 2005). Obwohl also die Expression dieser Gene andeutete, dass Zellen von Stamm ATCC10231 phagozytiert worden sind, wurden keine

weiteren Indizien hierfür gefunden. So waren z.B. die typischen Markergene für oxidativen (*CAT1*) und nitrosativen (*YHB1*) Stress nur gering exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden andere Stress-assoziierte Gene wie *HSP78*, *HSP90*, *DDR48*, *HSP104*, *HSP12* und *SSA4* während des Infektionsprozesses hochreguliert. Da aber *HSP78*, *HSP90* und *SSA4* während der Interaktion mit Blut herunterreguliert werden (Fradin *et al.*, 2003), ist es unwahrscheinlich, dass die Hochregulation dieser Gene etwas mit Phagozytose zu tun haben. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang noch, dass Hsp90 als Haupttarget von protektiven Antikörpern eine zentrale Rolle während einer Infektion zukommt (Matthews *et al.*, 1991; Matthews und Burnie, 1992). Warum die Hitzeschockgene jedoch hochreguliert werden, ist nicht klar. Zumindest von *HSP12* weiß man jedoch, dass das Gen bei Eisen- bzw. Kupfermangel hochreguliert wird (Lan *et al.*, 2004; van Bakel *et al.*, 2005).

Dass die Phagozytose durch Neutrophile kaum eine Rolle bei einer intraperitonealen Infektion spielt, wird dadurch unterstützt, dass die Expressionsprofile keinen Aminosäuremangel anzeigten. Bei einer Phagozytose von *C. albicans* durch Neutrophile herrscht jedoch Aminosäuremangel (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 2005) und wird durch die Hochregulation durch das Stickstoffregulationsgen *GCN4* oder durch die Hochregulation von Genen, die für Proteine der Aminosäurebiosynthese kodieren, angezeigt. Bei der vorliegenden intraperitonealen Infektion war die Expression dieser Gene unverändert oder sogar leicht runterreguliert. Erklärbar wäre dieses Phänomen mit der Expression von sekretorischen Aspartatproteasen (Saps). Diese könnten dem Pilz helfen, Proteine aus dem Wirtsgewebe aufzuschließen, so dass diese als Stickstoffquelle genutzt werden können. So wurden während der *in vivo* und *ex vivo* Infektion die Hyphen-assoziierten Gene *SAP4-6* und dabei insbesondere *SAP5* hochreguliert. Zusätzlich wurde zu den späteren Infektionszeitpunkten auch *SAP2* exprimiert. Das von *SAP2* kodierte Protein ist zumindest *in vitro* die hauptverantwortliche Protease für die Verwendung von Proteinen als einziger Stickstoffquelle. Ähnliche Ergebnisse wurden von Staib *et al.* nach einer intraperitonealen Infektion der Maus mit Hilfe der *In-vitro*-Expressions-Technologie (IVET) gefunden (Staib *et al.*, 1999).

Neben Stickstoff müssen allerdings während der Infektion auch andere Nährstoffe aus der Umgebung in die Pilzzelle transportiert werden. So ist es nicht verwunderlich, dass Gene, die für Eisen-, Kupfer-, Zink- oder Phosphattransporter kodieren (*FTR1*, *CTR1*, *ZRT1*, *PHO84*, *PHO89*), hochreguliert waren. Die Bedeutung

solcher Gene für das Überleben, die Virulenz und die Invasivität wurde sowohl für *C. albicans* als auch für andere Mikroorganismen gezeigt (Lucas und Lee, 2000; Ramanan und Wang, 2000; Davis *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2003; Marvin *et al.*, 2004; Peirs *et al.*, 2005). Interessanterweise waren einige Transporter-Gene wie *FTR1* bei Stamm SC5314 stärker exprimiert als bei Stamm ATCC10231. Dies würde darauf hindeuten, dass entweder die extrazellulären Umweltbedingungen von Stamm ATCC10231 nicht korrekt wahrgenommen wurden oder dass das Lebergewebe während der Invasion eine prinzipiell nährstoffarme Umgebung darstellt und somit Transporter-Gene für eine erfolgreiche Invasion in ausreichendem Maße exprimiert werden müssen. Dies gilt vermutlich vor allem dann, wenn noch keine Hepatocyten zerstört worden sind.

Auf der anderen Seite gab es aber auch Gene, die in Stamm ATCC10231 stärker exprimiert wurden als in Stamm SC5314. Neben den oben bereits erwähnten Genen des Glyoxylatzyklus waren das insbesondere Gene, die für Proteine der Ergosterolbiosynthese kodieren (*ERG2*, *ERG7*, *ERG11*, *ERG26*, *ERG27*, *ERG251*). Dies würde die erhöhte *in vitro* Resistenz von Stamm ATCC10231 gegenüber Itraconazol erklären und könnte ein Indiz für erhöhten Stress im Vergleich zu Stamm SC5314 sein. Für einige Gene der Ergosterolbiosynthese konnte auch gezeigt werden, dass sie unter sauerstoffarmen Bedingungen verstärkt exprimiert werden (Setiadi *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass unter eisenlimitierenden Bedingungen die Membranfluidität in *C. albicans* erhöht ist (Prasad *et al.*, 2006), so dass durch den Einbau von Ergosterol in die Membran dieser Effekt ausgeglichen werden könnte.

#### **4.3.3.2 Adhäsion und Hyphen**

Um an Wirtsoberflächen adhären zu können, muss *C. albicans* Adhäsionsfaktoren exprimieren. Dazu gehören unter anderem die Hyphen-assoziierten Gene *ALS3* und *HWP1*. Diese beiden Gene waren demnach auch zu allen *in vivo* Infektionszeitpunkten exprimiert. Dies zeigte, dass Adhäsionsfaktoren schon vor Beginn der eigentlichen Adhäsion aber auch noch während der Invasion exprimiert werden. Da die beiden Gene jedoch sowohl im invasiven Stamm SC5314 als auch im nicht-invasiven Stamm ATCC10231 exprimiert wurden, lässt sich vermuten, dass die Adhäsion keine ausreichende Bedingung für eine erfolgreiche Invasion darstellt.

Dies bestätigte wiederum die Ergebnisse, wonach es keinen Unterschied in der Adhäsion *in vitro* zwischen Stamm SC5314 und Stamm ATCC10231 gab (s. o.).

In *C. albicans* kommt der Ausbildung von Hyphen eine zentrale Funktion bei der Invasion zu. So zeigten die histologischen Bilder der *in vivo* und *ex vivo* Infektion, dass nahezu alle Zellen, die die Organkapsel durchdrungen hatten und in tieferes Gewebe eingedrungen waren, Hyphen waren. Mit der Hyphenbildung ist gleichzeitig ein distinktes Transkriptionsprogramm assoziiert. Zu diesem Programm gehört z.B. die Expression der Gene *SAP4-6*, von denen gezeigt werden konnte, dass sie eine entscheidende Rolle sowohl bei einer intraperitonealen als auch bei einer systemischen Infektion einnehmen (Sanglard *et al.*, 1997a; Felk *et al.*, 2002). Allerdings werden, entsprechend den Adhäsionsfaktoren, Hyphen von beiden Stämmen ausgebildet und Hyphen-assoziierte Gene von beiden Stämmen exprimiert. Dies unterstreicht Arbeiten, wonach der physikalische Druck von Hyphen alleine nicht ausreicht, um in Gewebe einzudringen (Ravishankar *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2002). Obwohl nicht auszuschließen ist, dass einige der Hyphen-spezifischen Proteine in Stamm ATCC10231 nicht funktionell sind, ist es dennoch wahrscheinlicher, dass Stamm ATCC10231 bestimmte Gene nicht exprimieren kann, die für eine Invasion nötig wären.

#### 4.3.4 Die Rolle des pH-Werts während einer Infektion

Aus verschiedenen *in vitro* Untersuchungen weiß man, dass Serumbestandteile, Nährstoffmangel, anaerobe Bedingungen oder Kontakt zu hydrophoben Oberflächen den Hefe-Myzel-Übergang bei *C. albicans* induzieren können (Sanchez-Martinez und Perez-Martin, 2001). Daneben ist ein weiterer gut untersuchter Faktor der Hypheninduktion ein erhöhter pH-Wert (Davis, 2003). Auch die Daten der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass der pH-Wert eine entscheidende Rolle für *C. albicans* bei der Penetration in Gewebe und für das Überleben in der Maus spielt. Der physiologische pH-Wert der Bauchhöhle beträgt ca. 7,4 (Silbernagl und Despopoulos, 1991). Die *in vivo* und *ex vivo* Transkriptionsprofile zeigen, dass *C. albicans* diesen pH-Wert wahrnehmen kann (z.B. wird das Markergen für einen neutralen bis alkalischen pH-Wert, *PHR1*, hochreguliert) und dass *C. albicans* auf diesen erhöhten pH-Wert durch die Bildung von Hyphen und durch zelluläre Adaption reagieren kann.

#### 4.3.4.1. Der pH-Wert und die Eisenaufnahme

Eine physiologische Konsequenz aus dem leicht alkalischen pH-Wert ist die reduzierte Verfügbarkeit von löslichen Eisen-(Fe<sup>2+</sup>)-Ionen. Des Weiteren spielen einige Wirtsproteine (z.B. Ferritin) eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen, indem sie freie Eisen-Ionen fest binden. Dieses Abwehrsystem wird deshalb auch „Nährstoff-Immunität“ genannt (Weissman und Kornitzer, 2004). Aus diesem Grund ist es für erfolgreiche Pathogene notwendig, Mechanismen zu entwickeln, die eine Eisenaufnahme aus Wirtsgewebe ermöglichen. Auch *C. albicans* hat mehrere Wege entwickelt, Eisen aufzunehmen (Ramanan und Wang, 2000; Heymann *et al.*, 2002; Weissman und Kornitzer, 2004). Dazu gehört unter anderem ein niedrigaffines und ein hochaffines Eisen-Transporter-System, wobei das Letztere essentiell unter eisenlimitierenden Bedingungen ist (Ramanan und Wang, 2000).

Die Transkriptionsprofile zeigten, dass Gene, die für Proteine der Eisenaufnahme kodieren, zu den späten Infektionszeitpunkten hochreguliert werden (*FET5*, *FTR1*) bzw. eine stärkere Expression während des Infektionsverlaufs zeigten (*CFL1*, *RBT5*, *FRE5*, *CTR1*). Da die Expression dieser Gene am stärksten während der Invasionsphase war und weil diese Gene im nicht-invasiven Stamm ATCC10231 nicht hochreguliert wurden, scheint die Eisenaufnahme besonders in der Penetrationsphase in das Gewebe eine bedeutende Rolle zu spielen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen, die in gesundes Lebergewebe eingedrungen waren, weniger freies Eisen zur Verfügung hatten als in der Bauchhöhle. Unterstrichen wird dieser Aspekt von der Tatsache, dass Leberabszesse durch *C. albicans* besonders in zuvor geschädigten Lebern vorkommen, bei denen die Konzentration an freiem Eisen erhöht ist (Bullen *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei *in vivo* Transkriptionsprofilen invasiver Bakterien wie *Yersinia pestis* erzielt werden (Lathem *et al.*, 2005; Sebbane *et al.*, 2006). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Gewebeinvasion mit einer Hochregulierung von Genen der Eisen- oder Hämaufnahme verbunden ist.

#### 4.3.4.2 Der pH-Wert und die Phosphataufnahme

Ein weiterer Nährstoff, der während einer *C. albicans* Infektion limitiert und mit dem externen pH-Wert assoziiert zu sein scheint, ist Phosphat. Phosphat ist ein

essentieller Makronährstoff, der u. a. für die Synthese von Nucleinsäuren und Phospholipiden benötigt wird. Eine Adaption an Phosphat-limitierte Bedingungen ist daher für die Persistenz von intrazellulären und invasiven Bakterien wie *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella typhimurium* sehr bedeutsam (Lucas und Lee, 2000; Collins *et al.*, 2003; Peirs *et al.*, 2005).

Während einer intraperitonealen Infektion mit *C. albicans* wurde *PHO84*, ein Gen, welches für einen putativen Phosphattransporter kodiert, hochreguliert. Über *PHO84* und ein weiteres stark exprimiertes Transportergen, *PHO89*, ist in *C. albicans* bekannt, dass sie unter alkalischen Bedingungen hochreguliert werden (Bensen *et al.*, 2004), und dass die Regulation auch über das *White-opaque-switching* erfolgt (Lan *et al.*, 2002). In *Yarrowia lipolytica* konnte für zwei homologe Transporter gezeigt werden, dass sie über die extrazelluläre Phosphatkonzentration und den pH-Wert reguliert werden (Zvyagilskaya *et al.*, 2001) und für *PHO84* aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das Gen transient unter Phosphatmangel exprimiert wird (Thomas und O'Shea, 2005). Da *PHO84* in den vorliegenden Transkriptionsprofilen von *C. albicans* auch transient exprimiert wird (höchste Expression 3 h nach Beginn der Infektion), kann spekuliert werden, dass es vor allem in der Bauchhöhle einen Phosphatmangel gibt, der durch die Invasion in das Lebergewebe aufgehoben werden kann.

Im Zusammenhang mit der Nährstoffaufnahme während einer Infektion soll nicht unerwähnt bleiben, dass *C. albicans* vermutlich den extrazellulären pH-Wert modifizieren kann. So wurde *PMA1*, das Gen, welches für die Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase kodiert, während der Infektion hochreguliert. Pma1 fungiert als Protonenpumpe, um den intrazellulären pH-Wert von *C. albicans* zu regulieren. Gleichzeitig wird die Aktivität der Pumpe dafür benötigt, ein ausreichendes Membranpotential für die sekundäre Nährstoffaufnahme, wie z.B. den Transport von Phosphat, zu gewährleisten.

Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass *C. albicans* auf die Umgebung des Wirtsgewebes reagiert und entsprechend adaptiert. Eine Grundvoraussetzung für die Adaption ist dabei die korrekte Wahrnehmung sich ändernder Umweltbedingungen, wie z.B. eine Änderung des pH-Werts.

### 4.3.5 Vergleich der Lebertranskriptionsprofile mit den Profilen anderer Infektionsmodelle

Obwohl der Vergleich der Transkriptionsprofile verschiedener Infektionsmodelle relativ schwierig ist, konnten dennoch Parallelen und Unterschiede zwischen den Profilen der intraperitonealen Infektion und anderer Infektionsmodelle beobachtet werden.

Markergene (Glyoxylatzyklus, Peptid- und Aminosäuretransporter), die eine Interaktion mit Neutrophilen und/oder Makrophagen andeuten (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Fradin *et al.*, 2005), wurden nur teilweise (Glyoxylatzyklus) in Stamm ATCC10231 während der Infektion hochreguliert. Wie bereits erwähnt, deutet dies darauf hin, dass die Masse der *Candida*-Zellen während der intraperitonealen Infektion keinen direkten Kontakt zu den Phagozyten des Immunsystems hat.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass während einer *i. p.* Infektion kein direkter Kontakt zu Phagozyten besteht, ist die transiente Hochregulation von Genen der Proteinbiosynthese und der Glykolyse. So konnte gezeigt werden, dass bei Kontakt zu Makrophagen die Translation reprimiert wurde (Lorenz *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu waren die Proteinsynthese und die Glykolyse in Vollblut in *C. albicans* Populationen, die keinen Kontakt zu Phagozyten hatten, hochreguliert (Fradin *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 2005). In Bezug auf die Verfügbarkeit einer C-Quelle ähnelt die intraperitoneale Infektion daher auch eher einer *ex vivo* Infektion von Blut als z.B. einer *in vivo* Infektion der Niere (intravenös infiziert). Während der Infektion der Niere wird der Glukose-Metabolismus runterreguliert, so dass davon auszugehen ist, dass in der Niere ein glukosearmes Milieu vorliegt (Andes *et al.*, 2005). Generell scheint die Infektion der Niere über das Blut kaum Gemeinsamkeiten mit der intraperitonealen Infektion der Leber aufzuweisen. So wurden in der Niere 85 % aller regulierten *Candida*-Gene runterreguliert (Andes *et al.*, 2005). Hochregulierte Gene fanden sich bei der Stressantwort, der Transkription und bei Hyphen-assoziierten Genen (Andes *et al.*, 2005). Ähnlich der intraperitonealen Infektion, bei der nur 46 % aller differentiell exprimierten Gene runterreguliert waren (Stamm SC5314), wurden Hyphen-assoziierte Gene auch in anderen Infektionsmodellen hochreguliert (Fradin *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2004; Andes *et al.*, 2005; Fradin *et al.*, 2005). Dies bedeutet, dass in diesen

Infektionsmodellen die Morphogenese von *C. albicans* durch Serumbestandteile, Nährstoffmangel und/oder Kontakt zu Wirtszellen induziert wird.

Die beschriebenen Modelle zeigen zwar Parallelen zur intraperitonealen Infektion, haben jedoch einen großen Unterschied: es handelt sich bei den Modellen entweder um *in vitro* Versuche mit Zellkulturen oder um intravenöse Infektionen, bei der die *Candida*-Zellen nicht aktiv in Gewebe penetrieren müssen.

In einem *in vitro* Modell einer oralen Infektion penetrieren *Candida*-Zellen in tiefer gelegene Schichten des verwendeten rekonstituierten humanen Epithels (RHE). Vergleicht man Transkriptionsdaten, die aus der Infektion von RHE gewonnen wurden (pers. Mitteilung K. Zakikhany), so lassen sich auch hier wieder Parallelen und Unterschiede zur intraperitonealen Infektion erkennen. In beiden Modellen werden Gene der Glykolyse (*KGD1*, *KGD2*, *PFK2*) hochreguliert, was auf eine ähnliche Nährstoffsituation in Bezug auf Glukose hindeutet. Im RHE-Modell gibt es aber wohl auch eine Population von *C. albicans* Zellen, denen Glukose als C-Quelle nicht ausreichend zur Verfügung steht. In dieser Population wird *ICL1*, ein Schlüsselgen des Glyoxylatzyklus hochreguliert. Weiterhin werden in beiden Modellen Hyphen-assoziierte Gene wie *ECE1*, *ALS3* und *SOD5* hochreguliert. Insbesondere die Expression von *ALS3* zeigt dabei, dass in beiden Infektionsmodellen die Adhäsion ein zentraler Schritt für eine erfolgreiche Invasion ist. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Als3 ein pilzliches Invasin darstellt, welches Cadherine der Wirtszellen imitiert, und über die Bindung an N-Cadherin auf Endothelzellen bzw. E-Cadherin auf oralen Epithelzellen Endocytosemechanismen der Wirtszellen induziert (Phan *et al.*, 2007). Der pH-Wert scheint auch in beiden Modellen ähnlich wahrgenommen zu werden. So werden bei der RHE-Infektion *PHR1* und *PMA1* hochreguliert. Es lässt sich somit spekulieren, ob bei einer oralen Infektion *C. albicans* ebenfalls aktiv versucht, den extrazellulären pH-Wert zu beeinflussen.

Die Unterschiede zwischen den beiden Invasionsmodellen beziehen sich z. T. auf Gene, die Stress andeuten. Während auf dem RHE vermutlich eher nitrosativer Stress vorherrscht und somit die entsprechenden Gene (*YHB1*, *YHB3*) hochreguliert werden, zeigt *C. albicans* während der intraperitonealen Infektion als Antwort auf die Stresssituation eine Hochregulation von *HSP90* und *DDR48*. Auf Seiten der Leberinfektion stehen weiterhin Gene, die im Zusammenhang mit der Eisen- und

Zinkaufnahme stehen (*FTR1*, *FET5*, *ZRT1*). Dass diese drei Gene nur während der intraperitonealen Infektion hochreguliert werden, unterstreicht erneut, dass die Leber eine extrem eisenarme Umgebung darstellt. Dieser Mangel an Eisen könnte auch erklären, warum in der Leber im Gegensatz zum RHE Gene der Ergosterolbiosynthese (*ERG11*, *ERG8*, *ERG6*) stärker exprimiert werden. Wie bereits oben erwähnt führt Eisenmangel zu einer erhöhten Membranfluidität (Prasad *et al.*, 2006), welche durch einen verstärkten Einbau von Ergosterol in die Plasmamembran ausgeglichen werden könnte.

#### 4.4 Die putative Metalloproteinase Axl1 hat keinen Einfluss auf die Invasion

Eines der Gene, welches während der intraperitonealen Infektion hochreguliert war, ist *AXL1*. Das homologe Protein in *S. cerevisiae* ist in der Membran des Sprossungshalses lokalisiert (Lord *et al.*, 2002) und hat bei haploiden Zellen einen Einfluss auf das axiale Wachstum (Fujita *et al.*, 1994). Weiterhin ist ScAxl1 in die Prozessierung des **a**-Faktors involviert (Adames *et al.*, 1995) und eine Deletion des Gens führt unter anderem zu einem hyperinvasiven Phänotyp (Cullen und Sprague, 2002).

Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *AXL1* in *C. albicans* zu gänzlich anderen phänotypischen Veränderungen. Während sich bei der  $\Delta axl1$  Mutante die Invasivität im Matrigel-Assay nicht veränderte, so konnte auf Hyphen-induzierenden Medien eine deutliche Reduktion der Hyphenbildung beobachtet werden. Auf einem glukosearmen Medium war die Mutante zwar dazu in der Lage, in den Agar einzudringen, erreichte im Gegensatz zur Kontrolle aber nur eine geringe Tiefe und hatte weniger Verzweigungen der Hyphen. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass in *C. albicans* Axl1 keinen Einfluss auf die Invasion *per se* hat, dass das Protein jedoch die Quantität und vor allem die Qualität der Hyphen beeinträchtigen kann. Da in einer Arbeit von Tsong *et al.* gezeigt werden konnte, dass *AXL1* in *C. albicans* unter Pheromon-Gabe ausschließlich in **a**-Stämmen induziert wird (Tsong *et al.*, 2006), lässt sich spekulieren, dass Axl1 in *C. albicans* ähnlich wie in *S. cerevisiae* in die Prozessierung des **a**-Faktors involviert sein könnte. Cullen und

Sprague diskutierten, dass das Verschwinden von Axl1 ein Signal für distale Sprossung ist und deswegen die  $\Delta axl1$  Mutante in *S. cerevisiae* einen hyperinvasiven Phänotyp zeigte (Cullen und Sprague, 2002). In *C. albicans* scheint Axl1 eher einen positiven Einfluss auf das Teilungsmuster zu haben, da die  $\Delta axl1$  Mutante in *C. albicans* eine vermindert Hyphenbildung zeigte. In weiterführenden Arbeiten wäre die genaue Rolle von Axl1 in *C. albicans* sowohl bei der Sprossung bzw. Hyphenbildung als auch bei der Paarung aufzuklären.

#### 4.5 *DFG16* kodiert für einen putativen Membransensor des Rim101-Signaltransduktionswegs

Eines der fünf Gene, welche während der *in vivo* und *ex vivo* Infektion in Stamm SC5314 aber nicht in Stamm ATCC10231 hochreguliert waren, war *DFG16*. Die Analyse der Promotorsequenz von *DFG16* aus Stamm SC5314 und Stamm ATCC10231 zeigte dabei, dass es in Stamm ATCC10231 im Vergleich zu Stamm SC5314 neben einigen Basenaustauschen vor allem eine Deletion im Bereich zwischen -130 und -145 gab. In diesem Bereich konnte eine putative Bindestelle in der Sequenz von Stamm SC5314 für ein *Enhancer Binding Protein* (cEBP) ausgemacht werden. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren reguliert in Säugerzellen verschiedene Prozesse der Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Johnson, 2005). In *C. albicans* konnten bisher jedoch keine cEBP-Homologe ausfindig gemacht werden, so dass fraglich ist, ob die Deletion im Promotorbereich von Stamm ATCC10231 einen direkten Einfluss auf die Expression von *DFG16* hat, oder ob andere Faktoren, wie z.B. eine Mutation in einem Transkriptionsfaktor, für die unterschiedliche Expression in den beiden Stämmen verantwortlich sind.

Für *DFG16* konnte bereits gezeigt werden, dass das Gen für eine Komponente des Rim101-Signaltransduktionswegs kodiert und somit in die Antwort auf den extrazellulären alkalischen pH-Wert in *C. albicans* involviert ist (Barwell *et al.*, 2005). Dies gilt auch für das homologe Gen in *S. cerevisiae*. Phylogenetische Analysen der Aminosäuresequenz von Dfg16 aus *C. albicans* ergaben, dass es neben der Homologie zu Dfg16 aus *S. cerevisiae* auch Ähnlichkeiten zu PalH aus *A. nidulans* und Rim21 aus *C. albicans* und *S. cerevisiae* gab. PalH ist dabei der putative

Membransensor des zum Rim101-homologen PacC-Signaltransduktionswegs in *A. nidulans* (Herranz *et al.*, 2005). *DFG16* aus *C. albicans* kodiert ähnlich wie *PALH* aus *A. nidulans* für ein Protein mit sieben Transmembrandomänen und einem cytoplasmatischen C-Terminus. Weiterhin besitzt Dfg16 wie alle PalH-ähnlichen Proteine ein stark konserviertes LGR-Motiv, welches in *A. nidulans* für die Bindung von PalF, der nächsten Komponente des Signaltransduktionswegs, verantwortlich ist (Herranz *et al.*, 2005). Die Lokalisationsstudie dieser Arbeit bestätigte, dass Dfg16 überwiegend in der Plasmamembran von *C. albicans* lokalisiert ist, so dass auch Dfg16 ein putativer pH-Sensor in *C. albicans* sein könnte.

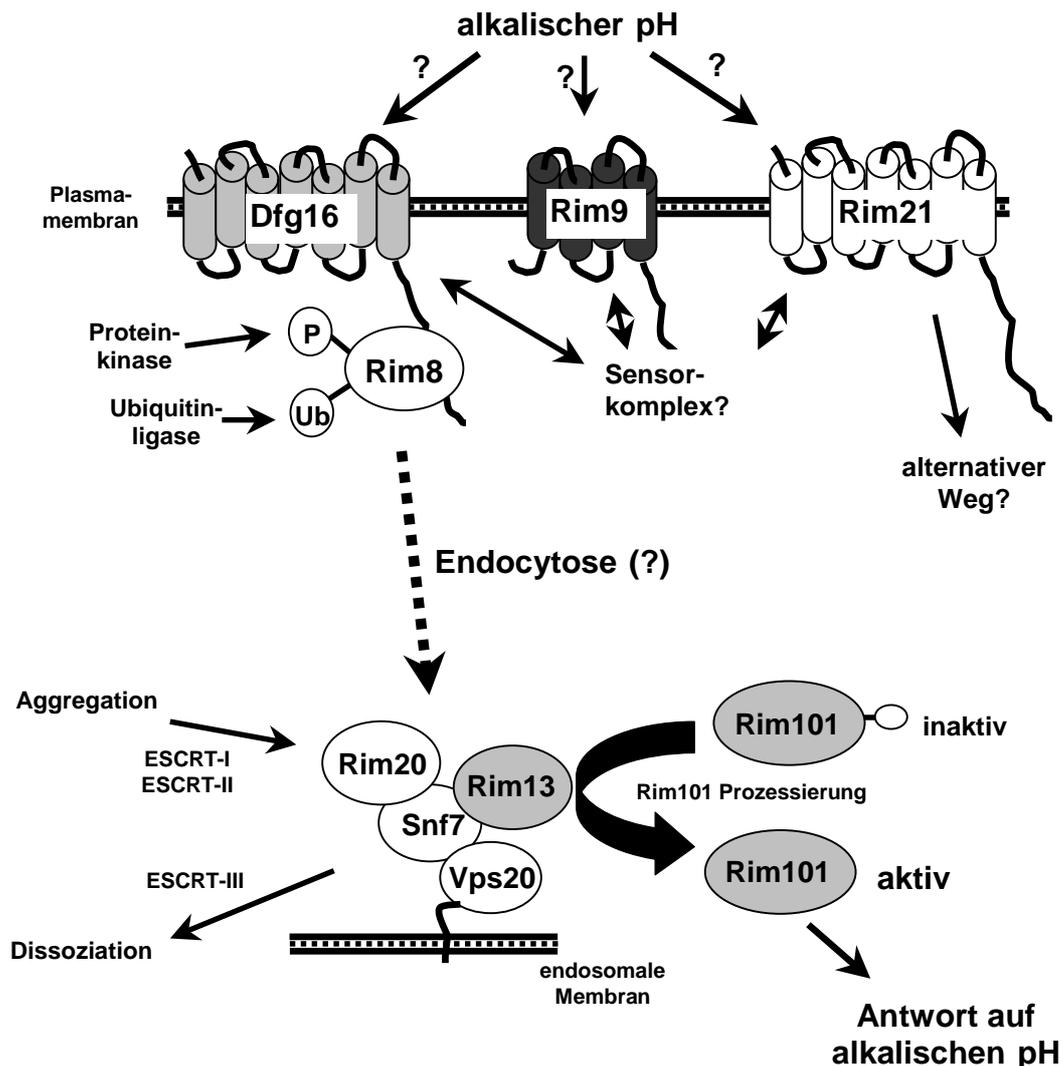
Einer der stärksten Phänotypen der  $\Delta dfg16$  Mutante war die Unfähigkeit Hyphen auf Agarplatten bei pH 8 auszubilden (Abb. 3.42 und (Barwell *et al.*, 2005)). Außerdem war die Mutante nicht in der Lage auf dem Matrigel bei alkalischem pH-Wert Hyphen auszubilden bzw. zu transmigrieren. Demnach ist der pH-Wert ein sehr starkes Signal für die Induzierung der Morphogenese und kann nicht immer durch eine kontaktbedingte Induktion (Kumamoto, 2005) aufgehoben werden. Vielmehr bestimmt die Art der Oberfläche, ob durch Kontaktinduktion Hyphen ausgebildet werden. Während die  $\Delta dfg16$  Mutante auf Agar bzw. auf Matrigel nicht in der Lage war, Hyphen auszubilden, wurde jedoch bei einer stark hydrophoben Plastikoberfläche der pH-Defekt zumindest teilweise aufgehoben. Somit wird die Morphogenese von *C. albicans in vivo* vermutlich durch einen Mix aus verschiedenen Faktoren induziert. Dass die Ausprägung eines Virulenzfaktors bzw. der Virulenz im Allgemeinen nicht durch nur einen Faktor bestimmt wird, konnte bereits bei Bakterien gezeigt werden. So ist z. B. die Virulenz unterschiedlicher *Pseudomonas aeruginosa* Stämme multifaktoriell und kombinatorisch bedingt (Lee *et al.*, 2006).

Das Ausbleiben einer adäquaten pH-Antwort auf den alkalischen pH-Wert durch die Deletion von *DFG16* hat aber noch weitere Effekte. So wuchs die  $\Delta dfg16$  Mutante schlecht unter eisenlimitierenden Bedingungen bei pH 8, ein Phänotyp, der auch schon bei der  $\Delta rim101$  Mutante von *S. cerevisiae* und *C. albicans* beobachtet worden ist (Lamb *et al.*, 2001; Bensen *et al.*, 2004). Die Mutante zeigte weiterhin eine erhöhte Sensibilität gegenüber erhöhter Kationenkonzentrationen (Lamb *et al.*, 2001). Da es zwischen der Fähigkeit zur Adaption an eine hohe Salzkonzentration und der Pathogenität einzelner *C. albicans* Stämme eine Korrelation zu geben scheint (Schmid *et al.*, 1995), könnte dieser Aspekt zur verminderten Virulenz der

$\Delta dfg16$  Mutante beitragen. Dass diese Defekte im Zusammenhang mit einer anomalen pH-Wahrnehmung der Mutante stehen, wurde durch das Transkriptionsprofil der  $\Delta dfg16$  Mutante bei leicht alkalischem pH-Wert unterstrichen. Verschiedene Gene, die im Wildtyp bei neutralem bis alkalischen pH-Wert und während einer intraperitonealen Infektion hochreguliert waren, waren in der  $\Delta dfg16$  Mutante runterreguliert. Dazu gehörten vor allem Gene, die mit der Hyphenbildung, der Eisen- und der Phosphataufnahme assoziiert sind. Einige dieser Gene wurden in der  $\Delta rim101$  Mutante ähnlich reguliert (Bensen *et al.*, 2004). Dies unterstreicht wiederum die Hypothese, dass Dfg16 in die Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen (pH-Wert) involviert ist. Eine Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen ist ein wichtiges Attribut, um im Wirt zu überleben. Aus diesen Gründen überrascht es nicht, dass die  $\Delta dfg16$  Mutante im Mausmodell einer systemischen Infektion nahezu avirulent ist. Dies konnte auch für die Mutante des zentralen Transkriptionsfaktors der pH-Antwort, Rim101, gezeigt werden (Davis *et al.*, 2000).

An dieser Stelle sollte allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass die  $\Delta dfg16$  Mutante und die  $\Delta rim101$  Mutante nicht identische Phänotypen zeigten. So bildete z.B. die  $\Delta rim101$  Mutante deutlich kürzere Hyphen aus als die  $\Delta dfg16$  Mutante und Gene wie *CSA1*, *ECE1*, *HWP1*, *HYR1*, *IHD1* und *RBT1* waren in der  $\Delta rim101$  Mutante bei einem alkalischen pH-Wert runterreguliert (Bensen *et al.*, 2004), nicht aber in der  $\Delta dfg16$  Mutante. Diese Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Bedingungen unter denen die Mutanten in verschiedenen Laboren analysiert wurden oder durch die Anwesenheit eines weiteren pH-Sensors erklärt werden. Wie oben bereits beschrieben, gibt es sowohl in *C. albicans* wie auch in *S. cerevisiae* und weiteren nahe verwandten Arten ein zu Dfg16 homologes Protein: Rim21. Die Aminosäuresequenz von Rim21 weist alle Eigenschaften von Dfg16 auf, so dass dieses Protein ein zweiter Sensor sein könnte. Dieser könnte zusammen mit Dfg16 und einem dritten Protein (Rim9), welches auch ein LGR-Motiv besitzt aber nur vier Transmembrandomänen aufweist, an der pH-Erkennung als Sensor beteiligt sein. Möglicherweise agieren diese drei Proteine auch gemeinsam in einem Sensorkomplex. Nach der Wahrnehmung des alkalischen pH-Werts könnte Rim8 ähnlich wie PalF aus *A. nidulans* an ein LGR-Motiv binden und daraufhin phosphoryliert und ubiquitiniert werden (Herranz *et al.*, 2005). Der gesamte Sensor-Rim8-Komplex würde dann über Endocytose auf dem ESCRT-Weg (Babst, 2005) zur

endosomalen Membran gelangen und dort würde über weitere Komponenten des Rim101-Signaltransduktionswegs die Protease Rim13 (Li *et al.*, 2004) so in Position gebracht, dass sie den Transkriptionsfaktor Rim101 in die aktive Form überführen kann. Der aktivierte Transkriptionsfaktor Rim101 kann daraufhin in den Kern wandern und dort die Antwort auf den alkalischen pH-Wert vermitteln. Diese spekulative Hypothese der pH-Wahrnehmung ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.1:** Der postulierte Rim101-Signaltransduktionsweg in *C. albicans*. Der alkalische pH-Wert wird über Sensoren in der Plasmamembran (Dfg16, Rim9 und/oder Rim21) wahrgenommen. Dadurch kann Rim8 an das LGR-Motiv binden, wird phosphoryliert und ubiquitiniert und der gesamte Komplex gelangt über Endocytose auf dem so genannten ESCRT-Weg (Babst, 2005) zur endosomalen Membran. An der endosomalen Membran wird über Rim20, Snf7 und Vps20 die Protease Rim13 so in Position gebracht, dass sie den inaktiven Transkriptionsfaktor Rim101 in die aktive Form prozessieren kann. Das aktive Rim101 kann daraufhin in den Kern wandern und dort die Antwort auf den alkalischen pH-Wert vermitteln. Abbildung verändert nach (Hayashi *et al.*, 2005; Herranz *et al.*, 2005).

## 4.6 Gibt es Invasionsgene in *C. albicans*?

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die Invasion von *C. albicans* mit der Expression eines distinkten Gensets verbunden ist und dass die Regulation dieser Gene eng mit der Wahrnehmung der Umweltbedingungen verknüpft ist. Mindestens zwei Gruppen von Genen sollten dabei in die Invasion involviert sein: (i) Gene, die für die Initiierung der Invasion in Gewebe benötigt werden und (ii) Gene, die auf sich ändernde Umweltbedingungen während der Invasion reagieren. Von diesen Genen kann man erwarten, dass einige von ihnen vor der eigentlichen Invasion exprimiert werden, um z.B. die Invasion zu initiieren, während andere Gene erst im Laufe der Invasion exprimiert werden, um z.B. den Invasionsstatus aufrecht zu erhalten.

Jedes dieser Gene kann natürlich auch während einer nicht-invasiven Lebensphase des Pilzes exprimiert werden (z.B. bei oberflächlichem Wachstum). So hängt die Invasion vermutlich sowohl von einer koordinierten Regulation der Genexpression als auch von der Antwort des Wirts ab. Interessanterweise zeigen sich bei einem solchen Modell Parallelen zu invasiven Tumoren von Säugern (Ozanne *et al.*, 2006). So wird die Expression von Rezeptoren, wie z.B. CD44 (Marhaba und Zoller, 2004), die normalerweise in zelluläre Funktionen wie die Organisation des Zytoskeletts oder die Zellentwicklung eingebunden sind, bei invasiven Tumoren hochreguliert. Diese Sensoren können dann ein genetisches Programm starten, welches durch Transkriptionsfaktoren wie AP-1 reguliert wird (Eferl und Wagner, 2003; Spence *et al.*, 2006). Dieses genetische Programm reguliert u. a. die Expression von Genen, die für extrazelluläre Matrixmetalloproteinasen kodieren, von denen gezeigt werden konnte, dass sie eine Rolle bei der Invasion der Tumore spielen (Westermarck und Kahari, 1999). Eine Inhibierung oder Blockierung eines solchen Rezeptors kann die Invasivität von transformierten Zellen herabsetzen (Ozanne *et al.*, 2006). Die Identifizierung zellulärer Rezeptoren, deren Blockierung die Tumordinvasion verhindern würde, steht deshalb zusammen mit der Erforschung von Substanzen, die solche Rezeptoren blockieren könnten, im Mittelpunkt der Krebsforschung. Dementsprechend wären auch pilzspezifische Rezeptoren, deren Inhibierung eine Invasion verhindern könnte, ein interessantes Ziel für neue Antimykotika.

In der vorliegenden Arbeit konnte über den Vergleich eines invasiven und eines nicht-invasiven *C. albicans* Stamms gezeigt werden, dass sich die Invasivität nicht auf genomischer Ebene unterscheidet, sondern dass die Invasioneigenschaft vermutlich multifaktoriell und kombinatorisch ist und auf transkriptioneller Ebene koordiniert zu werden scheint.

*DFG16* ist dabei ein Gen, dessen Expression mit der Invasion von *C. albicans* in Lebergewebe assoziiert ist. Mutanten, denen dieses Gen fehlt, zeigen multiple pH-abhängige Phänotypen und sind avirulent. Weitere Gene, die auch in dieser Arbeit als Invasions-assoziiert gefunden wurden, könnten außerdem wichtige Funktionen während einer invasiven Infektion mit *C. albicans* zukommen.

#### 4.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde sowohl eine phänotypische als auch genotypische Charakterisierung der beiden *C. albicans* Stämme SC5314 und ATCC10231 durchgeführt. Obwohl alle Gene aus Stamm SC5314 auch in Stamm ATCC10231 vorhanden sind, wäre es in Zukunft interessant, in wie weit sich z.B. die intergenischen Regionen der beiden Stämme unterscheiden. Dass Unterschiede in der Promotorregion vorliegen können, wurde bei der Promotoranalyse von *DFG16* gezeigt. Aber auch die Unterschiede in den Phänotypen von Stamm SC5314 und Stamm ATCC10231 müssten noch näher charakterisiert werden. Insbesondere sollte dabei ein Augenmerk auf den Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus gelegt werden, da hierüber auch eine Verbindung zur Virulenz von *C. albicans* bestehen könnte.

Die  $\Delta dfg16$  Mutante zeigte, dass dem pH-Wert eine entscheidende Rolle bei der Invasion von *C. albicans* in Lebergewebe zukommt. Um in Zukunft entsprechende Antimykotika, die in den Rim101-Signaltransduktionsweg eingreifen könnten, zu finden, ist es unabdingbar, den Signaltransduktionsweg weiter zu charakterisieren und vor allem die Rolle der putativen Rezeptoren Rim9 und Rim21 in der pH-Wahrnehmung zu analysieren.

Schließlich wurden in dieser Arbeit etliche weitere Gene - viele davon mit unbekannter Funktion - identifiziert, die während einer Invasion exprimiert werden.

---

Die Bedeutung dieser Gene für die Pathogenität von *C. albicans* gilt es aufzuklären, um zu verstehen wie dieser medizinisch bedeutende Pilz lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen kann.