

## Zusammenfassung

Der opportunistische Erreger *Candida albicans* verursacht die meisten Mykosen beim Menschen. Zur Zeit gibt es nur wenige wirkungsvolle Medikamente gegen invasive oder systemische *Candida albicans*-Infektionen. Durch Zunahme der Risikopatienten und der Zahl resistenter Pilze wird die Situation weiter verschärft. Bei *Candida albicans* ist die Virulenz multifaktoriell, d.h., dass dieser Pilz ein breites Reservoir an sogenannten Virulenzfaktoren besitzt, die ihm helfen, Infektionen auszulösen und dem Immunsystem zu widerstehen. Die Analyse dieser Faktoren ist unumgänglich, um die Infektion zu verstehen und daraus neue Strategien zur Bekämpfung des Pathogens zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmalig eine Genfamilie von sekretierten Lipasen bei einem humanpathogenen Pilz beschrieben. Sie besitzt mindestens zehn Mitglieder (*LIP1-LIP10*). Um neue klinisch relevante Angriffspunkte zu identifizieren, sollte die Bedeutung sekretierter lipolytischer Enzyme, speziell der Lipase-Genfamilie, bei der Besiedlung und Infektion von *Candida albicans* aufgeklärt werden. Dazu wurden während verschiedener Infektionen umfangreiche *in vivo* Expressionsstudien mittels RT-PCR durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass ein neu identifiziertes Phospholipase A-Gen sowohl *in vitro* als auch bei Infektionen künstlicher Schleimhäute konstitutiv exprimiert wird. Außerdem wurde die Expression in einer vaginalen Patientenprobe nachgewiesen. Daher könnte das Enzym von *Candida albicans* eine Rolle bei oberflächlichen Schleimhautinfektionen spielen.

Es wurde ein etabliertes Mausmodell einer systemischen Candidose bezüglich der zeitlichen Expression der zehn Lipase-Gene untersucht. Die Lipase-Gene *LIP5* und *LIP8* wurden vor allem von *Candida*-Zellen exprimiert, die Leber und Nieren befielen, während von *LIP10* zu keiner untersuchten Zeit Transkripte in diesen Organen nachgewiesen wurden. Der Expressionsstatus der *Candida*-Zellen hängt eindeutig vom Stadium der systemischen Infektion ab, ist aber unabhängig vom Infektionsort. Die Mitglieder der *LIP*-Genfamilie sind darüber hinaus vermutlich auch an der Besiedlung von humanem Gewebe beteiligt, da Transkripte von allen zehn Lipase-Genen während einer experimentellen Infektion eines künstlichen oralen Schleimhautmodells detektiert wurden. Erneut konnte eine zeitliche Regulation der Lipase-Genexpression nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde zum ersten Mal die zeitlich kontrollierte *in vivo* Expression von *LIP10* nachgewiesen. In einem vaginalen Schleimhaut-Modell wurden *LIP4* bis *LIP8* konstitutiv exprimiert. Auch in diesem Modell konnte eine zeitliche Regulation der Lipase-Genexpression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Flexibilität des pathogenen Pilzes, als Antwort auf veränderte Umgebungsreize sein Expressionsstatus den gegebenen Umständen anzupassen.

Einer der stärksten Hinweise, dass die Lipase-Genfamilie für Virulenzfaktoren kodiert, war der Nachweis der Expression verschiedener Lipase-Gene in klinischen Proben von Patienten, die an unterschiedlichen Candidosen erkrankt waren. Um Patientenproben untersuchen zu können, wurde eine PCR-basierte Methode zur Unterscheidung der nahverwandten Hefen *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* etabliert. Hybridisierungen zeigten, dass auch bei *Candida dubliniensis* lipase-ähnliche Sequenzen vorhanden sind. Die neu entdeckte Lipase-Genfamilie besteht aus mindestens fünf Mitgliedern. Untersuchungen ergaben einen neuen Infektionsort von *Candida dubliniensis*, den Zehen-Zwischenraum. Somit kann diese Hefe auch epidermale Infektionen auslösen.

In den *Candida albicans*-Patientenproben wurden vor allem *LIP8*-Transkripte nachgewiesen. Um zu klären, ob es sich bei *LIP8* um einen Virulenzfaktor für den Pilz handelt, wurde das Gen mittels der *URA*-Blaster-Methode erfolgreich zerstört, was mittels Southern Blot-Analyse und einer RT-PCR nachgewiesen wurde. Des Weiteren wurden Retransformanden generiert. Parallel dazu wurden zwei neue molekularbiologische Strategien erfolgreich entwickelt, um die Genexpression von *LIP8* mit einer einzigen Transformation - basierend auf einem RNA-Interferenz/Antisense-Mechanismus - vollständig zu inhibieren. Durch eine Homologiesuche nach RNA-Interferenz-relevanten Proteinen in der *Candida albicans*-Datenbank konnte ein Argonaut-homologes Protein identifiziert werden. Zusätzlich wurde eine Überexpressionsmutante hergestellt.

Infektionsstudien deuteten an, dass Lip8 nicht an der Infektion oraler und vaginaler künstlicher Schleimhäute sowie bei systemischen Infektionen von Mäusen beteiligt ist, da die Mutanten genauso virulent waren wie der Wildtyp. Im Gegensatz dazu ergaben *in vitro* Analysen des Phänotyps, dass die *lip8*-Mutanten zu einer vermehrten Filamentbildung auf unterschiedlichen Festmedien und in Flüssigmedien neigten. Es wurde eine direkte Korrelation zwischen pH-Wert, Temperatur und der Myzelbildung festgestellt. Zusätzlich zeigten die *lip8*-Mutanten eine erhöhte Eigenaggregation. Die Verhinderung der *LIP8*-Genexpression verursachte ein verringertes Wachstum in verschiedenen Lipid-Medien. Von klinischer Relevanz war die geringere Proliferation der Mutanten in einer fetthaltigen, parenteralen Ernährungslösung. Zusätzlich zeigten die Mutanten auch eine um bis zu 30 % niedrigere, extrazelluläre lipolytische Aktivität als der Wildtyp. Eine Überexpressionsmutante hingegen wies eine Aktivität von 450 % des Wildtyp-Wertes auf.

Lip8 stellt sowohl bei intravenösen als auch bei Ösophagus-Infektionen einen Virulenzfaktor von *Candida albicans* dar. Bei der intravenösen Infektion von Mäusen wurde bei einer Deletionsmutante, im Gegensatz zum wt, keine letale Wirkung festgestellt. Um zu klären, warum eine verringerte Virulenz im intravenösen Modell auftrat, wurden die Infektionsschritte der Adhäsion und Penetration an isolierten humanen Endothelzellen genauer untersucht.

Lip8 nahm keinen Einfluß auf die Endothel-Adhäsion bzw. andere Lipasen konnten das Fehlen von Lip8 kompensieren. Eine Knock-down-Mutante war in der Fähigkeit, Endothelzellen zu zerstören, beeinträchtigt. Die Überexpressionsmutante zeigte das entgegengesetzte Verhalten, da sie invasiver war als der wt.

Außerdem konnte eindeutig gezeigt werden, dass Lip8 bei einer Infektion des Ösophagus von Mäusen essentiell für die Penetration der Kardial-Antrum-Falte ist. Im gleichen Modell wies eine *LIP8*-Überexpressionsmutante eine weitaus größere Invasivität auf als der Wildtyp.

Mit Lipase-Inhibitoren sowie verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden konnte die Proliferation von *Candida albicans* in Lipid-Medien beeinträchtigt oder sogar ganz unterbunden werden. Mit einer Kombination von vier verschiedenen Antisense-Oligonukleotid-Phosphothioaten, die gegen Lipase-Transkripte von *LIP4*, *LIP5*, *LIP6* und *LIP8* gerichtet waren, konnte eine Wachstumshemmung von 50 % erzielt werden. Die Alkaloide Quinin und Quinidin konnten mit der höchsten eingesetzten Konzentration das Wachstum von *Candida albicans* im Lipid-Medium vollständig hemmen. Quinin konnte außerdem die extrazelluläre lipolytische Aktivität von *Candida albicans* um bis zu 50 % erniedrigen.

Es wurde gezeigt, dass die extrazelluläre lipolytische Aktivität des Pilzes für das Wachstum in einer parenteralen Ernährungslösung verantwortlich ist, da das Wachstum und die Aktivität mit Acetylsalicylsäure um ca. 50 % gehemmt werden konnte. Mit der Inhibition von Lipasen konnte in der vorliegenden Arbeit eine neue Wirkung von Acetylsalicylsäure identifiziert werden. Der humane Lipase-Inhibitor Orlistat<sup>®</sup> konnte die lipolytische Aktivität ebenfalls hemmen. Damit wurde gezeigt, dass sekretierte lipolytische Enzyme bei dem multipotenten Erreger *Candida albicans* die Erschließung von Lipiden als Nährstoffquellen und die Invasion bei verschiedenen Infektionsmodellen ermöglichen.

Das Verständnis der Rolle der Lipasen von *Candida albicans* könnte zu neuen Therapieansätzen führen. Diese Arbeit hat mit dem Lipase-Gen *LIP8* einen neuen Ansatzpunkte für eine antimykotische Therapie identifiziert.