

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anzahl lebensbedrohlicher Mykosen ist in den letzten Jahren dramatisch gestiegen. Unter anderen human pathogenen Pilzarten gehört auch *Candida albicans* zu denen, die die meisten Rezidiven hervorrufen. *C. albicans* gehört zu sogenannten opportunistischen Pilzen, die zu den kommensalen Organismen gehören und bei gesunden Menschen harmlos sind. Im Fall einer krankhaften oder medikamentös hervorgerufenen Dysfunktion des Immunsystems oder aber einer Gleichgewichtsstörung der Mikroflora infolge einer Antibiotikabehandlung ist der Pilz in der Lage, in die tieferen Gewebe und Blutgefäßsystem einzudringen und gefolgt davon schwere systemische Mykosen hervorzurufen.

Die Forschung an *C. albicans* konzentriert sich weitgehend auf die Untersuchung der Virulenzfaktoren, die dem Pilz das Eindringen in den Wirtsorganismus ermöglichen. Die sekretorische Aspartat-Proteasen gehören zu den meist diskutierten Virulenzfaktoren. Sie tragen zum Abbau der Wirtsproteine bei und fördern damit die Invasion des Pilzes. *C. albicans* besitzt eine Genfamilie mit zehn Genen für sekretorische Aspartat-Proteasen (SAP), die von dem Pilz unterschiedlich eingesetzt werden können. Da die einzelnen Mitglieder dieser Genfamilie im Laufe der Jahr nacheinander identifiziert wurden, gibt es keine systematische Untersuchung, die alle Proteasen dieser Familie abdeckt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung des Expressionsprofils aller bekannten SAP-Gene *in vitro* unter verschiedenen Umweltbedingungen. Ein weiterer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung des Expressionsmusters *in vivo* während Infektionen gelegt. Dabei wurde das dynamische Expressionsverhalten von SAP-Genen bei intra peritonealen Mausinfektionen untersucht. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Gene *SAP9* und *SAP10* charakterisiert und in Bezug auf die proteolytischen Eigenschaften funktionell untersucht.

Unter den gewählten *in vitro* Bedingungen, wie Myzelinduktion, Wachstum in Protein- bzw. Ammoniumsulfat-haltigen Medien als einziger Stickstoffquelle und phänotypischer Wechsel, wurden die Expressionsprofile einzelner SAP-

Gene in *C. albicans* mittels RT-PCR untersucht. Dabei konnte die meiste Expression der *SAP*-Gene in Medium mit Protein als einziger Stickstoffquelle festgestellt werden, welches als Protease-induzierend gilt. Dagegen wurde bei Abwesenheit von Protein in Minimalmedium mit Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle die Transkription vieler *SAP*-Gene herabreguliert. Ausschließlich die Transkripte von *SAP2*, *SAP8*, *SAP9* und *SAP10* konnten im Medium ohne Proteinzusatz zu allen untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden. Verschiedene Medien zur Induktion der Myzelausbildung wirkten sich unterschiedlich auf die Expression der *SAP*-Gene aus. Im Gegensatz zu definierten Induktionsmedien konnten bei der Gegenwart von Serum keine *SAP1*-, *SAP2*- und *SAP3*-Transkripte nachgewiesen werden, was auf eine hemmende Wirkung einiger Serumkomponenten auf die Expression dieser Gene bzw. auf eine differenzierte Expression der *SAPs* in verschiedenen Nischen im Wirtsorganismus hindeuten kann. Die myzelspezifischen Gene *SAP4* und *SAP6* waren in beiden myzelinduzierenden Medien gegenläufig exprimiert: die Transkription von *SAP6* war in definierten und von *SAP4* in serumhaltigen Medien am stärksten. Beim phänotypischen Wechsel des Stammes WO-I war die Expression der *SAP*-Gene allgemein, vor allem aber von *SAP1*, *SAP3*, *SAP6* und *SAP8*, in der „opaque“ Form stärker als in der „white“ Form.

Bei der Analyse der *SAP*-Expression im Oesophagus oral infizierter DBA/2- und Balb/c-Mäusen wurde eine direkte Korrelation zwischen der Abwehrstärke des Wirtsorganismus und der *SAP*-Expression festgestellt. Die Defizienz von DBA/2-Mäusen für den Komplementfaktor C5 bewirkte im Vergleich zu Balb/c-Mäusen eine stärkere Proliferation von *Candida*-Zellen und die verstärkte Expression der Gene *SAP2*, *SAP3*, *SAP8* und *SAP10*. Transkripte von *SAP4-6* und *SAP9* wurden in den meisten untersuchten Oesophagusproben von beiden Mäuse-Stämmen nachgewiesen.

Die Untersuchung der Expression der *SAP*-Gene im zeitlichen Verlauf während einer intra peritonealen (i. p.) Infektion im Mausmodell zeigte die Expression von *SAP2* und *SAP4-6* in allen untersuchten Organen nach 4, 8, 24 und 72 Stunden. Die Transkripte von *SAP3* und *SAP10* wurden deutlich

zum Zeitpunkt der Invasion von *C. albicans* in die Leber (8 Stunden) aber weder in späteren Infektionsstadien in der Leber (72 Stunden) noch in den sekundär infizierten Nieren nachgewiesen. In keinem der untersuchten Organe wurden *SAP7*-Transkripte nachgewiesen. Diese Versuche bestätigen die Beteiligung der Gene *SAP4-6* bei der Invasion von *C. albicans*. Ein in dieser Arbeit hergestelltes Plasmid zur Retransformation einer $\Delta sap6$ -Mutante trug weiterhin dazu bei zu beweisen, dass vor allem *SAP6* für Invasionen notwendig ist (FELK *et al.*, angereicht).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression der myzelspezifischen Gene *SAP4-6* wahrscheinlich über die MAP-Kinase- und cAMP-Kaskaden reguliert wird. Die gleichzeitige Deletion der Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p, welche zur Inaktivierung beider Kaskaden führt und als Folge die Myzeldefizienz von *C. albicans* hervorruft, reduzierte stark die Expression von *SAP5* und *SAP6* im FCS-Medium *in vitro*. Bei der i. p. Mausinfektion war die Inhibition der Genexpression der *SAP4-6* in den $\Delta efg1$ -, $\Delta cph1$ -Einzelmutanten und $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Doppelmutante weniger ausgeprägt, als *in vitro*. Transkripte von *SAP1* und *SAP3* konnten in der $\Delta cph1$ -Einzelmutante und von *SAP8* in der $\Delta efg1$ -Einzelmutante im i. p. Mausmodell nach 24 h Infektion nicht nachgewiesen werden. Die beobachteten Veränderungen im Expressionsprofil der *SAP*-Gene in diesen Mutanten deuten darauf hin, dass sich hier nicht nur die Myzeldefizienz alleine, sondern auch andere Faktoren, wie die Aspartat-Proteasen, auf die Virulenz von *C. albicans* auswirken. Diese Ergebnisse bestätigen das Postulat über den simultanen Beitrag mehrerer Attribute des Pilzes zur Virulenz (CUTLER, 1991, ODDS, 1994b).

In dieser Arbeit wurde das *SAP10*-Gen vollständig sequenziert und auf Grund der hohen Homologie zu *SAP9* der *SAP*-Genfamilie zugeordnet. Die Proteinsequenz beider Proteasen lässt vermuten, dass es sich nicht um sekretorische, sondern vermutlich durch GPI-Anker mit der Zellwand oder Plasmamembran verbundene Proteine handelt. Für eine Funktionsanalyse von *SAP9* und *SAP10* wurden diese Gene ausgeschaltet, die entsprechenden Mutanten charakterisiert und die Proteine untersucht. Die hergestellten Mutanten hatten eine reduzierte Fähigkeit Myzel auszubilden

und waren leicht gegenüber osmotischem Schock empfindlich. Die maximale Aktivität von Sap9p und Sap10p wurden bei pH 2,3 und 4,5 gemessen. Eine hohe Homologie zu den prozessierenden Proteasen Yps1p und Yps2p von *Saccharomyces cerevisiae* und die nur geringfügige Hydrolyse von Serumalbumin durch Sap9p und Sap10p deuten ebenfalls auf eine prozessierende Funktion der beiden Proteasen hin. Es konnte außerdem durch Southern-Blot-Analyse gezeigt werden, dass auch bei nicht proteolytischen *Candida* Spezies ähnliche Gene existieren. Jedoch bleibt die genaue Funktion von Sap9p und Sap10p unklar und bedarf weitere Untersuchungen.