

I.

EINLEITUNG

I.1. *Candida albicans* ist ein opportunistischer Pathogen

In der letzten Dekade ist die Anzahl von Pilzinfektionen beim Menschen dramatisch gestiegen (FOX, 1993, FRIDKIN & JARVIS, 1996). Am häufigsten werden humane Pilzinfektionen von *Candida*-Arten verursacht und davon die überwiegende Mehrheit von *C. albicans* (FRIDKIN & JARVIS, 1996, NGUYEN *et al.*, 1996, TIRABOSCHI *et al.*, 2000). *C. albicans* ist ein opportunistischer Pathogen (ODDS, 1988), der zur kommensalen Mikroflora der Mundhöhle, der Verdauungs- und vaginalen Trakte des Menschen gehört (ODDS, 1988, SOLL *et al.*, 1991a). In einem gesunden Wirtsorganismus stehen die angesiedelten Keime in starker Konkurrenz um das Nahrungsangebot mit den anderen Mikroorganismen der Schleimhäute. Auch die humorale und zelluläre Immunabwehr des Menschen verhindert eine starke Vermehrung und die Invasion des Pilzes. Durch die Abschwächung des Immunsystems infolge einer Krankheit wie einer HIV-Infektion, einer schweren Operation, einer medikamentösen Behandlung mit Immunsuppressiva, einer Verletzung der Hautintegrität durch Katheter bzw. Prothesen oder durch einer verminderten bakteriellen Körperflora nach einer Antibiotikabehandlung erhält *Candida* einen Wachstumsvorteil (STEINMETZ, 1999). Ein stark erhöhtes Wachstum des Pilzes auf Haut oder Schleimhaut kann zu einer Etablierung einer lokalen, mukokutanen *Candida*-Infektion, einer sogenannten Kandidose, führen. Die Entwicklung systemischer Mykosen beginnt mit dem Gelangen der *Candida*-Zellen in die Blutbahn z. B. durch eine gastrointestinale Persistenz, durch Biofilm-kontaminierte medizinische Instrumente oder eine Verletzung (SAMONIS *et al.*, 1990, HAWSER & DOUGLAS, 1994, COLE *et al.*, 1996).

C. albicans verfügt über eine Reihe von Mechanismen, die es dem Pilz erlauben, sich auf bzw. in dem Wirtsorganismus zu etablieren. Zu diesen werden oberflächliche Virulenzmoleküle und Hydrophobizität, molekulares Mimikry, Thigmotropismus, phänotypischer Wechsel, Dimorphismus und

lytische Enzyme gezählt (ODDS, 1988, CUTLER, 1991, ODDS, 1994 a, b, SAN-BLAS *et al.*, 2000).

I.2. *C. albicans* verfügt über eine Reihe von Virulenzfaktoren

I.2.1. PHÄNOTYPISCHER WECHSEL

Die Fähigkeit von *C. albicans* sowohl als Kommensal als auch als Pathogen zu leben, sich den verschiedenen Nischen des Wirtsorganismus anzupassen, dem Immunsystem entgehen zu können und einer Therapie mit Antimykotika überstehen zu können sprechen für eine außerordentliche phänotypische Flexibilität des Pilzes. Die phänotypische Flexibilität kann theoretisch über Meiose und Rekombination, eine schnelle Modulation der Genexpression als Antwort auf geänderte Umweltbedingungen erreicht werden.

C. albicans ist ein diploider Organismus, dessen sexuelle Reproduktion noch nie beobachtet wurde. Seitdem das Genom von *C. albicans* komplett sequenziert (<http://www.stanford.edu/group/candida>) und auf Gene, die für mögliche Elemente einer meiotischen Teilung kodieren, untersucht worden war (TZUNG *et al.*, 2001), sind viele homologe Gene der mit *C. albicans* nahe verwandten Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, vor allem ein *MAT*-ähnlicher Locus (*MTL*), gefunden worden (HULL & JOHNSON, 1999, TZUNG *et al.*, 2001). Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine Rekombination bei *C. albicans* zwar vorkommt, aber ein äußerst seltenes Ereignis ist. Eine erfolgreiche Fusion konnte bei Zellen mit generierten homozygoten *MTL α* - und *MTL β* -Loci erreicht werden. Dabei wurde jedoch keine Meiose beobachtet (HULL *et al.*, 2000, MAGEE & MAGEE, 2000).

Ein Mechanismus mit dem sich *C. albicans* möglicherweise auf verschiedene Umweltbedingungen anpasst, ist das sogenannte „phänotypische Switching“.

Dabei können spontan mehrere Phänotypen generiert werden, die *C. albicans* erlauben, sich an die Veränderungen in der Umwelt anzupassen (SOLL, 2002). Es ist vorstellbar, dass bei dem „phänotypischen Switching“ das ganze Set von Virulenzfaktoren an eine neue Situation angepasst werden. Im Labor wurde dieses Phänomen dadurch entdeckt, dass bestimmte Stämme spontan und reversibel unterschiedliche Koloniemorphologien bildeten (SOLL, 1992). Die Zellen des klinischen Isolats WO-I wechseln mit einer Häufigkeit von 10^{-3} spontan zwischen den zwei Phänotypen „white“ und „opaque“ (SLUTSKY *et al.*, 1987). Die dramatischen Änderungen in den Zellen werden beim „white“-„opaque“ Übergang morphologisch ausgeprägt, indem weiße („white“) und graue („opaque“) Kolonien erzeugt werden, wobei die Hefe-Zellen des „white“ Typs rund und nur halb so groß sind wie die ovalen Zellen der „opaque“ Form (SLUTSKY *et al.*, 1987). Diese zwei Phänotypen unterscheiden sich aber nicht nur in der Koloniemorphologie, sondern weisen auch physiologische Unterschiede: in den Antigen-Eigenschaften (ANDERSON *et al.*, 1990), beim Hefe-Myzel-Übergang (ANDERSON *et al.*, 1989), in der Polypeptid-Synthese (SOLL *et al.*, 1991b), im Gehalt an Lipiden und Sterolen (GHANNOUM *et al.*, 1990), in der Sensitivität zu Neutrophilen und deren oxidativen Agenzien (KOLOTILA & DIAMOND, 1990) und in den Adhäsionseigenschaften (KENNEDY *et al.*, 1988) auf. Damit übt das „Switching“ bei *C. albicans* einen pleiotropen Effekt auf die unterschiedlichen Phänotypen aus. Dabei müssen mehrere Gene bzw. Gengruppen reguliert werden (SOLL, 2002). Der molekulare Mechanismus mit dem dies kontrolliert wird, ist noch unbekannt.

I.2.2. ADHÄSION

Die Oberflächenarchitektur von *C. albicans* spielt eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Umweltveränderungen und der Kolonisierung von Wirtsoberflächen. Die Oberfläche des Pilzes ist mit Liganden ausgestattet, die selektiv an die Oberflächen der Wirtszellen binden können. Die Adhäsion von *C. albicans* wird z. B. von extrazellulären Integrin-analogen Mannoproteinen (GUSTAFSON *et al.*, 1991, CHAFFIN *et al.*, 1998, HOSTETTER,

1998) oder den an die Gefäßendothelien (FILLER *et al.*, 1991, 1996) bzw. an die Makrophagen der Milz und Lymphknoten (LI & CUTLER, 1993, KANBE & CUTLER, 1998) bindenden Als-Glykoproteine (HOYER *et al.*, 1999) gewährleistet. Weitere Adhäsionsfaktoren sind die Myzel-Zellwand-spezifischen Hwp1p-Proteine (STAAB *et al.*, 1998, 1999) und die extrazellulären, Matrix-bindenden, hydrophoben Oberflächenproteine von *C. albicans* (SILVA *et al.*, 1995, MASUOKA *et al.*, 1999).

I.2.3. MOLEKULARES MIMIKRY

Candida ist dazu in der Lage, bestimmte Oberflächenkomponente des Wirtes zu kopieren oder zu binden. Dadurch werden die *Candida*-Zellen vom Immunsystem des Wirtes schlechter erkannt und verbessern so die Überlebenschancen. Als Tarnung (molekulares Mimikry) wird ein Mantel mit wirtshomologen Proteinen produziert oder es werden Proteine des Wirtes durch Rezeptoren direkt gebunden (MARCANTONIO & HYNES, 1988, TUOMANEN, 1993, ROSTAND & ESKO, 1997).

I.2.4. OBERFLÄCHENHYDROPHOBIZITÄT

Die Oberflächenhydrophobizität von *C. albicans* scheint von den Wachstumsbedingungen, der Zellmorphologie und der Wachstumsphase abhängig zu sein und wurde bei chronischen Kandidosen demonstriert (GLEE *et al.*, 1995). *In vitro* wurden hydrophobe Zellen in der stationären Wachstumsphase bei 23°C beobachtet, während Zellen in der stationären Wachstumsphase bei 37°C in der Abhängigkeit vom Medium eher hydrophile Eigenschaften hatten (HAZEN & HAZEN, 1988). Die hydrophoben Zellen sind im Vergleich zu den hydrophilen Zellen adhärenter zu Wirtssubstraten wie Mucin, Epithelzellen, Endothelzellen und extrazelluläre Matrix. Sie sind resistenter gegenüber Phagozytose und keimen schneller aus (ANTHLEY & HAZEN, 1988, HAZEN & HAZEN, 1988, HAZEN, 1989, HAZEN *et al.*, 1991, MASUOKA *et al.*, 1999, DE REPENTIGNY *et al.*, 2000, GLEE *et al.*, 2001).

I.2.5. DIMORPHISMUS

C. albicans kann zwischen den Zellformen Hefe, Myzel, Pseudomyzel und Chlamydosporen wechseln (Abb. 1). Meistens werden sphärische, proliferierende Hefezellen als kolonisierende Form betrachtet. Dagegen werden die durch apikales Wachstum auskeimenden, zylinderförmigen, multizellulären, septierten Hyphen als invasive Form betrachtet. Die Gesamtheit der Hyphen wird als Myzel bezeichnet. Pseudohyphen sind monozellular und heterogen in der Form. Sie werden von unipolar sprossenden Zellen gebildet, die sich verlängern und an der mütterlichen Zelle haften bleiben. An den Zellen der Pseudohyphen können unter bestimmten Bedingungen die dickwandigen, runden Chlamydosporen gebildet werden (MONTAZERI & HEDRICK, 1984, JOSHI *et al.*, 1993). Der morphologische Übergang von der Hefe zu Hyphe und umgekehrt wird als Dimorphismus bezeichnet und wird als Virulenzfaktor diskutiert (CUTLER, 1991, ODDS, 1994 a, b).

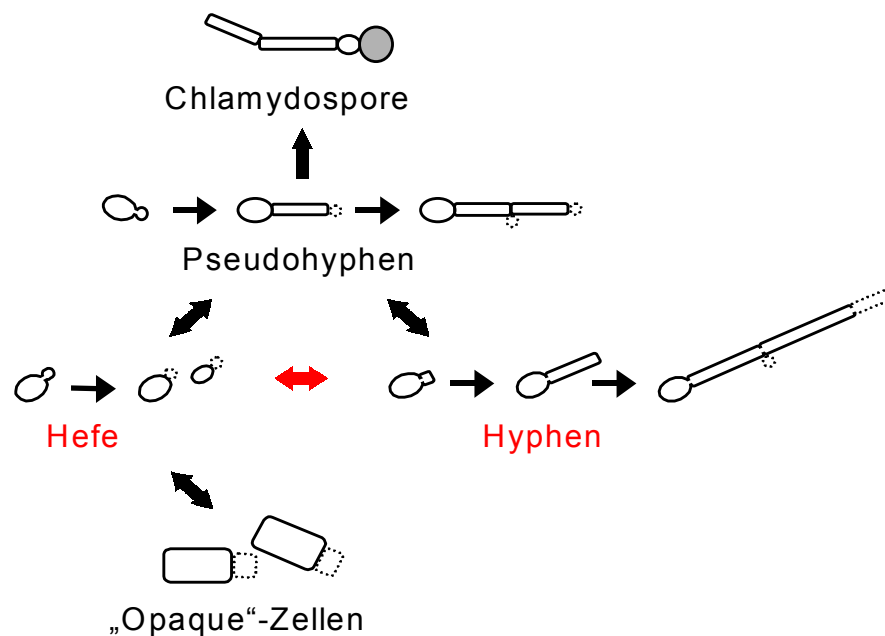


Abb. 1. Morphologiewechsel bei *C. albicans* (übernommen aus ERNST, 2000). Der opportunistische Pilz *C. albicans* ist in der Lage mehrere Zellformen zu bilden. Lediglich die Fähigkeit zwischen der Besiedlungsform Hefe und der invadierenden Form Hyphe zu wechseln, wird als Virulenzfaktor diskutiert und als Dimorphismus bezeichnet.

Die Entwicklung der Hyphen kann *in vitro* bei 37°C und neutralem pH-Wert (BUFFO *et al.*, 1984), Supplementation des Mediums mit Serum (SHEPHERD *et al.*, 1980, ERNST, 2000), Prolin bzw. N-Acetylglycosamin (DELBRÜCK & ERNST, 1993) oder unter Stressbedingungen wie Nährstoffmangel hervorgerufen werden.

Die molekulare Umwelt des Pilzes ändert sich im Laufe des Wachstums durch Verbrauch der Nährstoffe sowie durch die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten (RITZ & CRAWFORD, 1999). Auch wirtsbedingte Umweltsignale ändern sich während einer Infektion, wenn die Zellen z. B. in verschiedene Mikronischen eintreten oder wenn die Zellen in unterschiedliche Gewebe eindringen (BROWN & GOW, 1999). Die komplexen Umgebungsfaktoren wirken sich dabei auf die Morphologie des Pilzes aus. Die Entwicklung von Hyphen ist von zwei unterschiedlichen Gruppen von Faktoren abhängig: erstens, von der Natur, Anzahl und Intensität der Umgebungsfaktoren (Außenfaktoren) und, zweitens, von der Aktivität der Signalkaskaden einschließlich der Schlüssel-Transkriptionsfaktoren (ERNST, 2000). Das Auslösen der Signaltransduktion kann entweder durch die schwache simultane Stimulation mehrerer Signalkaskaden oder über eine einzelne stark stimulierte Signalkaskade erfolgen (ERNST, 2000).

Die Proteine Efg1p und Cph1p sind zwei Transkriptionsfaktoren, die durch die cAMP- und MAP-Signalkaskaden reguliert werden und homolog zu Phd1p und Ste12p in *S. cerevisiae* sind (GIMENO & FINK, 1994, LIU *et al.*, 1994, STOLDT *et al.*, 1997). Sie regulieren unter anderem die Morphologie bei *C. albicans* (Abb. 2). Efg1p ist ein cAMP-kontrollierter starker Regulator, der nicht nur den Hefe-Myzel-Übergang kontrolliert (LO *et al.*, 1997, STOLDT *et al.*, 1997), sondern auch in dem phänotypischen Wechsel und in der Bildung von Chlamydosporen involviert ist (SONNEBORN *et al.*, 1999a). Beim Wachstum einer $\Delta efg1$ -Mutante auf stark myzelinduzierendem Festmedium mit Serum-Zusatz war die Fähigkeit des Pilzes Myzel zu bilden komplett ausgefallen, jedoch kamen unter diesen Bedingungen vermehrt Pseudohyphen vor (LO *et al.*, 1997). Gleichzeitig zeigt die $\Delta efg1$ -Mutante

beim Wachstum unter mikroaerophilen (auf Festmedium unter einem Deckgläschen) und anaeroben Bedingungen keinen Defekt im Myzelwachstum und bildete sogar im Vergleich zum Wildtyp verstärkt Myzel (SONNEBORN *et al.*, 1999a). Die Transkription von *EFG1* wurde inaktiviert, sobald die Hyphenbindung initiiert wurde (STOLDT *et al.*, 1997). Beim phänotypischen Wechsel wurden die meisten *EFG1*-Transkripte in der „white“ und nicht in der „opaque“ Form nachgewiesen (SONNEBORN *et al.*, 1999b). Im Stamm CAI8, der nicht zwischen „opaque“ und „white“ Phänotypen wechseln kann und ausschließlich die „opaque“ Zellform bildet, wurde eine geringe Expression von *EFG1* festgestellt und die Überexpression dieses Gens bewirkte einen Wechsel zur „white“ Zellform (SONNEBORN *et al.*, 1999b). Die Disruption von *EFG1* im „Switching“-Stamm WO-I (SOLL, 1997) führte unter allen getesteten Bedingungen zum Verlust der Fähigkeit spontan zum „white“ Phänotyp zu wechseln (SRIKANTHA *et al.*, 2000).

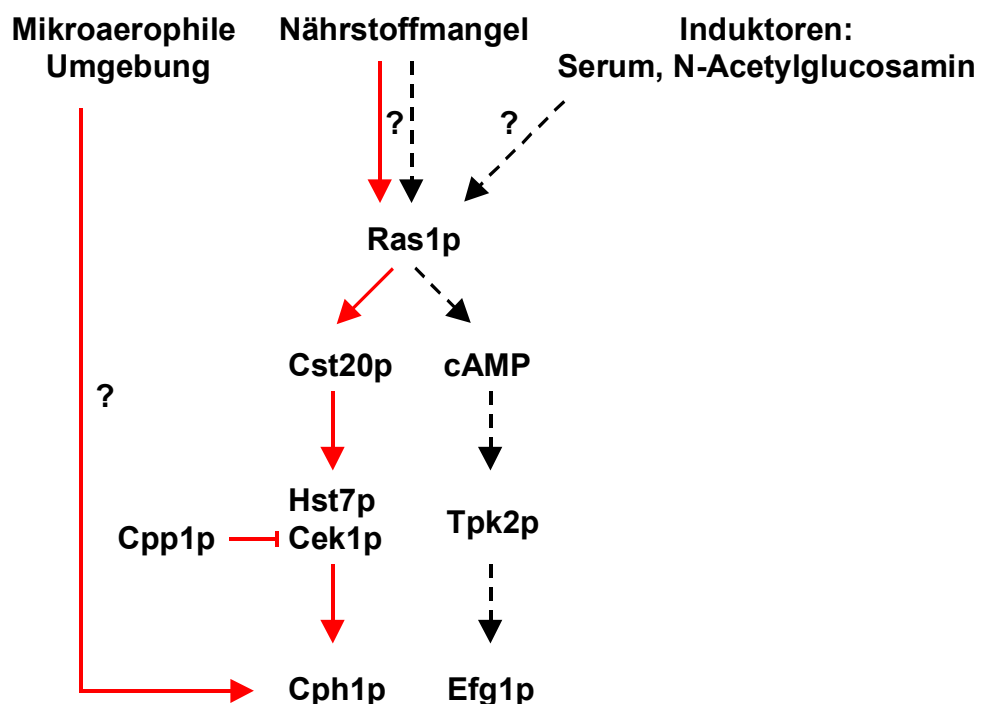


Abb. 2. Auslöser der Signaltransduktion und Signalkaskaden bei *C. albicans*. (CSANK *et al.*, 1998, BROWN & GOW, 1999, ERNST, 2000). Die Transkriptionsfaktoren Cph1p und Efg1p sind die zentralen Elemente der MAP- (rote Pfeile) und cAMP- (schwarze unterbrochene Pfeile) Signaltransduktionswege und regulieren unter anderem den Morphologiewechsel von der Hefe zur Myzelform.

Unter Stickstoffmangelbedingungen wird sowohl bei *S. cerevisiae* als auch bei *C. albicans* die MAP-Signalkaskade aktiviert und wird entsprechend Pseudomyzel- bei beiden Organismen bzw. Myzelwachstum bei *C. albicans* initiiert (LIU *et al.*, 1993, MADHANI & FINK, 1996). Die Deletionen der Gene dieser Signalkaskade bei *C. albicans* verursachten nur einen leichten Defekt in der Hyphenbildung beim Wachstum auf festen Minimalmedien und die Mutanten waren in der Lage mit der Zeit Hyphen und Pseudohyphen zu entwickeln. In flüssigen und auf festen Medien mit Serumzusatz wurde ein normales filamentöses Wachstum der $\Delta cph1$ -Mutante beobachtet (LIU *et al.*, 1994, KÖHLER & FINK, 1996, LEBERER *et al.*, 1996, CSANK *et al.*, 1998). Die $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Doppelmutante (LO *et al.*, 1997) war unter allen getesteten Bedingungen in der Hyphenbildung gestört. Im Gegensatz zur $\Delta efg1$ -Einzelmutante bildete sie jedoch kein Pseudomyzel auf festem Serum-Medium (LO *et al.*, 1997, SONNEBORN *et al.*, 1999a). In einem *in vivo* Test glich das Virulenzverhalten der $\Delta cph1$ -Mutante dem des Wildtyp-Stammes. Dagegen war die $\Delta efg1$ -Mutante in ihrer Virulenz stark abgeschwächt und die $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Doppelmutante erwies sich als avirulent (LO *et al.*, 1997). Somit können die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p als Virulenzregulatoren bezeichnet werden.

I.2.6. SEKRETORISCHE HYDROLASEN

Eine hohe Wachstumsrate und anspruchsloser Nahrungsbedarf wurden unter anderen als weitere Virulenzfaktoren herausgehoben (ODDS, 1994a). Durch langsames Wachstum lassen sich die proliferierenden Keime schnell von dem Wirt eliminieren. Ein vielseitiger Nahrungsbedarf des Keimes begrenzt außerdem die Verfügbarkeit der Mikronischen, in denen sich der Organismus vermehren kann, und bietet sich als hypothetischer negativer Virulenzfaktor an (ODDS, 1994a). *C. albicans* hat sich im Laufe der Evolution stark an den menschlichen Körper als Lebensraum adaptiert. Zur besseren Beschaffung von Nährstoffen werden hydrolytische Enzyme wie Lipasen, Phospholipasen und Proteasen von dem Pilz sezerniert, die menschliche

Gewebe zerstören können (STEHR *et al.*, 2000). Im Mittelpunkt der Diskussion um hydrolytische Enzyme als Virulenzfaktoren steht die proteolytische Aktivität von *C. albicans* (ODDS, 1994a). Von HOEGL *et al.* (1996) wurde über eine direkte Korrelation zwischen der Virulenz und der proteolytischen Aktivität von verschiedenen Stämmen von *C. albicans* berichtet. *C. albicans*-Stämme, die von HIV-infizierten Patienten mit oraler Kandidose isoliert wurden, wiesen dabei eine generell höhere enzymatische Aktivität als Kontrollstämmen auf.

I.3. Sekretorische Aspartat-Proteasen

I.3.1. DIE WICHTIGSTEN ENTDECKUNGEN

Die proteolytische Aktivität von *C. albicans* wurde zum ersten Mal von STAIB (1965) beschrieben. Er schlug vor, dass eine sekretierte Protease dem pathogenen Pilz ermöglicht, Serumproteine als Stickstoffquelle zu verwerten. Die proteolytische Aktivität von *C. albicans* entsprach der relativen Pathogenität von getesteten Stämmen (REMOLD *et al.*, 1968). Später demonstrierten MACDONALD und ODDS (1980) die Ausscheidung von Proteasen *in vivo*. In einer weiteren Arbeit zeigten sie, dass Protease defiziente Isolate eine geringere Virulenz besaßen (MACDONALD & ODDS, 1983). Von RÜCHEL (1981) wurde eine sezernierte Protease aus Kulturüberständen von *C. albicans* aufgereinigt und charakterisiert. Sie besaß Trypsinogen-Kinase-Aktivität, spaltete sämtliche getesteten Säuger-Proteine außer Ferritin und wurde durch Pepstatin A inhibiert. Nach diesen Eigenschaften wurde das isolierte Enzym zur Klasse der Carboxyl-Proteasen bzw. Aspartat-Proteasen (EC 3.4.23.6) zugeordnet. In weiteren Untersuchungen wurden Proteasen aus verschiedenen Stämmen isoliert und untersucht, die in ihren Eigenschaften und Substratspezifität Unterschiede zeigten (RÜCHEL *et al.*, 1982, RÜCHEL & BÖNING, 1983, NEGI *et al.*, 1984, RAY & PAYNE, 1990). Von HUBE *et al.* (1991) wurde das erste Gen für eine

Sekretorische Aspartat-Protease (*SAP*) *SAP1* mittels einer PCR-Strategie aufgrund zweier bekannten Sequenzen des aufgereinigten Proteins und einer bei allen Aspartat-Proteasen konservierten Sequenz um das katalytische Zentrum kloniert und sequenziert. Später wurde *SAP1* als „opaque“-Form spezifisches Gen des „Switching“-Stammes WO-I in einer cDNA-Bank identifiziert (MORROW *et al.*, 1992). Das Gen *SAP2* wurde wie *SAP1* aufgrund bekannter Proteinsequenzen entdeckt (WRIGHT *et al.*, 1992) In den darauffolgenden Jahren wurden weitere *SAP*-Gene durch Southern-Blot-Analysen mit den beiden bekannten Genen als Sonden unter niedrig stringenten Bedingungen identifiziert und kloniert (MAGEE *et al.*, 1993, WHITE *et al.*, 1993, MIYASAKI *et al.*, 1994, MONOD *et al.*, 1994, 1998). Das letzte Mitglied der *SAP*-Genfamilie (Tab. 1), *SAP10*, ist bei einer Untersuchung der publizierten Sequenzen des *Candida*-Genomprojektes gefunden worden (FELK *et al.*, 2000).

Gen	ORF (bp)	NCBI Acces. Nr.	chromosomale Lokalisation	Translatiertes Protein [AS]	N-terminale Erkenn. Seq.	Reifes Protein [AS]	Publikationen
SAP1	1173	A28872	6	391	2 KR	341	HUBE <i>et al.</i> , 1991 MAGEE <i>et al.</i> , 1993
SAP2	1194	A45280	R	398	2 KR	342	WRIGHT <i>et al.</i> , 1992 MAGEE <i>et al.</i> , 1993
SAP3	1194	L22358	3	398	1 KR	340	WHITE <i>et al.</i> , 1993
SAP4	1251	L12452	6	417	4 KR	342	MIYASAKI <i>et al.</i> , 1994
SAP5	1254	P43094	6	418	4 KR	342	MONOD <i>et al.</i> , 1994
SAP6	1254	P43095	6	418	4 KR	342	MONOD <i>et al.</i> , 1994
SAP7	1764	P43096	1	588	1 KK	377	MONOD <i>et al.</i> , 1994
SAP8	1215	O42778	3	405	2 KR	330	MONOD <i>et al.</i> , 1998
SAP9	1632	O42779	3	544	1 KR / 1 KK	494	MONOD <i>et al.</i> , 1998
SAP10	1323	AF146440	4	441	1 KR	403	FELK <i>et al.</i> , 2000

Tab. 1. Zehn Mitglieder der *SAP*-Genfamilie von *C. albicans* und abgeleitete Eigenschaften der Sap-Isoproteine. Abkürzungen: bp - Basenpaare, Acces. Nr. - GenBank accession number, AS - Aminosäuren, Erkenn. Seq. - Erkennungssequenzen.

I.3.2. STRUKTUR UND PROZESSIERUNG DER SAP-PROTEASEN

Aspartat-Proteasen besitzen in ihrem katalytischen Zentrum zwei Aspartat-Reste (DAVIES, 1990). Die Aminosäuren um diese Regionen sind stark konserviert. Die von der SAP-Genfamilie kodierten Aspartat-Proteasen weisen vier Cystein-Reste für Disulfidbrückenbildungen und viele weitere strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Als sekretorische Enzyme besitzen sie an ihrem N-Terminus ein Signalpeptid, welches die synthetisierten Präproteine in das Endoplasmatisches Retikulum (ER) dirigiert und bei der Einschleusung des Proteins in dieses Kompartiment von einer Signalpeptidase abgespalten wird. Die Sap-Proteasen sind Zymogene und werden im *trans*-Golgi-Apparat von der membrangebundenen Subtilisin-ähnlichen Serin-Protease Kex2p aktiviert. Kex2p erkennt spezifisch die N-terminalen dibasischen Motive Lysin-Arginin (KR) und Arginin-Arginin (RR) und spaltet die Proenzyme nach dem zweiten Aminosäurerest der Erkennungssequenz (ROCKWELL & FULLER, 1998). Die aktivierten Proteasen werden dann von der Zelle sezerniert. Die Deletion von *KEX2* verminderte die proteolytische Aktivität und löste ein Defekt in der Myzelbildung von *C. albicans* aus (NEWPORT & AGABIAN, 1997). Die $\Delta kex2$ -Mutante bildete unter myzelinduzierenden Bedingungen anormale Zellformen mit multiplen Nuclei und aggregierte stark. Das aktive Sap2p wurde zwar von der Mutante weiter hin sezerniert, war aber um eine Aminosäure am N-Terminus länger, was auf die Selbstprozessierung bzw. ein alternatives Prozessierungsenzym hinweisen könnte, das zwischen den beiden Aminosäurenresten der dibasischen Erkennungssequenz bei der Prozessierung spaltet (NEWPORT & AGABIAN, 1997). *S. cerevisiae* besitzt ein zu 65% homologes Kex2p-Enzym (NEWPORT & AGABIAN, 1997), welches zusammen mit den Aspartat-Proteasen Mkc7p (Yps2p) und Yap3p (Yps1p) in der Prozessierung von Pro- α -Pheromon und anderen sekretorischen Proproteinen synergistisch wirkt (KOMANO & FULLER, 1995). Die beiden Zellmembran-assoziierten Aspartat-Proteasen Yps1p und Yps2p wurden als Suppressoren des kälte-sensitiven und α -Pheromon defekten Phänotyps der $\Delta kex2$ -Mutante von *S. cerevisiae* detektiert (KOMANO & FULLER, 1995).

I.3.3. EIGENSCHAFTEN DER SAP-PROTEASEN

Beim Wachstum von *C. albicans* in Proteasen-induzierendem Medium mit Serumalbumin (BSA), Casein, Kollagen, Hämoglobin oder Keratin (REMOLD *et al.*, 1968, RAY & PAYNE, 1990) wurde von *C. albicans* hauptsächlich Sap2p sezerniert, das von mehreren Arbeitsgruppen aufgereinigt, charakterisiert und am N-Terminus sequenziert wurde (GANESAN *et al.*, 1991, RAY *et al.*, 1991, SULLIVAN & WRIGHT, 1992, MORRISON *et al.*, 1993). Die isolierten Sap2p-Proteasen besaßen ein Molekulargewicht von 40-45 kD, einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,2 und 4,5 und ein Aktivitätsoptimum bei pH 3,2-4,0 (Übersicht: HUBE, 1996). Die weiteren Proteasen Sap1p, Sap3p und Sap8p mit Molekulargewichten von 40 kD, 41-42 kD und 48 kD wurden nur in geringen Mengen detektiert (MORRISON *et al.*, 1993, WHITE *et al.*, 1993, SMOLENSKI *et al.*, 1997). Durch Überexpression von rekombinanten Saps in *S. cerevisiae*-, *Pichia pastoris*- bzw. *Escherichia coli*-Expressionssystemen konnten die einzelnen Proteasen Sap1p (SMOLENSKI *et al.*, 1997), Sap1p-Sap6p (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1998) bzw. Sap1p-Sap3p und Sap6p (KOELSCH *et al.*, 2000) in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden. Diese heterologen Aufreinigungen waren vor allem für Sap4p, Sap5p und Sap6p wichtig, da diese in *C. albicans* Kulturen nie proteinchemisch detektiert werden konnten und so bisher nicht für proteinchemische Versuche zur Verfügung standen. Die getestete Aktivität von Sap2p und Sap6p erreichte ihr Maximum bei pH 4,0, die von Sap1p und Sap3p bei pH 3,3 in Natriumphosphat-Citrat-Puffer mit Hämoglobin als Substrat (KOELSCH *et al.*, 2000). In Citrat-Puffer mit Casein als Substrat wurde das Aktivitäts-Optimum von Sap1p bei pH 4,5, von Sap2p und Sap3p bei pH 3,5 und von Sap4p, Sap5p und Sap6p bei pH 5,0 bestimmt (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1998). SMOLENSKI *et al.* (1997) berichteten über eine hoch signifikante Aktivität von Sap3p bei pH-Werten unter 2,5 in einer enzymatischen Reaktion mit BSA und Hämoglobin. Bei pH-Werten über 7,0 nahmen die Aktivitäten von Sap1p-, Sap2p- und Sap3p-Proteasen ab (SMOLENSKI *et al.* 1997). Dabei fiel die Aktivität von Sap3p drastisch und die von Sap1p sowie von Sap2p nur

leicht bei pH 7,5 ab. Die Aktivität von Sap6p blieb bis pH 8,0 unverändert (KOELSCH *et al.*, 2000).

I.3.4. EXPRESSION VON SAP-GENEN IN VITRO

Die Expression der SAP-Gene in *C. albicans* wird stammspezifisch in Abhängigkeit von Außenfaktoren reguliert. Wie auch die Sekretion von Sap2p waren die SAP2-Transkripte im BSA-Medium dominant. Dieses wurde weder von der Kohlenstoffquelle oder der Wachstumstemperatur (HUBE *et al.*, 1994) noch von dem phänotypischen „Switching“ (WHITE & AGABIAN, 1995) beeinflusst. Die Expression von SAP2 wird über einen positiven Feedback-Mechanismus reguliert (HUBE *et al.*, 1994). Die Transkription von SAP1 und SAP3 wurde in Verbindung mit dem phänotypischen Switching beobachtet (MORROW *et al.*, 1992), wobei die beiden Transkripte ausschließlich in den „opaque“ Zellen des WO-I Stammes nachgewiesen wurden (MORROW *et al.*, 1993, WHITE & AGABIAN, 1995). Die Expression von SAP4-6 wurde ausschließlich in der Hyphenform beim Wachstum in Serum-Medium (HUBE *et al.*, 1994) oder unter pH- und Temperatur-reguliertem Dimorphismus (WHITE & AGABIAN, 1995) festgestellt. Von den drei hyphenspezifischen Genen wurden die meisten Transkripte von SAP6, weniger von SAP5 und keine von SAP4 in myzelinduzierendem Medium bei neutralem pH-Wert detektiert (WHITE & AGABIAN, 1995). Die Expression von SAP7 wurde unter keinen der getesteten Bedingungen nachgewiesen (HUBE *et al.*, 1994). SAP8 mRNA wurde im Protein-induzierenden Medium in der früheren exponentiellen Wachstumsphase bei 25° und 37°C detektiert, wobei das Transkriptionsniveau bei niedrigeren Temperaturen am höchsten war (MONOD *et al.*, 1998). Unter den gleichen Bedingungen wurden die meisten Transkripte von SAP9 in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen. Aus den *in vitro* Untersuchungen ist ersichtlich, dass die zahlreichen SAP-Gene unterschiedlich reguliert werden. Die Regulationsmechanismen bzw. die Induktionsbedingungen einzelner SAP-Gene sind noch nicht klar. Die meisten Erkenntnisse über die Funktion dieser Gene könnten aus Untersuchungen, die einem natürlichen *Candida*-Infektionsablauf

entsprechen, gewonnen werden. Für diese Zwecke wurden *in vivo* und *in vitro* Infektionsmodelle etabliert.

I.3.5. EXPRESSION DER SAP-GENE *IN VIVO* UND IM RHE-MODELL

Die Expression von SAP-Genen *in vivo* wurde zum ersten Mal in einem Ratten-Modell der vaginalen Candidose demonstriert (DE BERNARDIS *et al.*, 1995). Von den untersuchten Genen SAP1-6 wurden während vaginalen Infektionen SAP1-, SAP2-, SAP3-, aber keine SAP4-, SAP5- oder SAP6-Transkripte festgestellt (DE BERNARDIS *et al.*, 2001). In der Analyse einer Patientenprobe einer unbehandelten, akuten oralen Candidose zeigte sich die Expression von SAP1, SAP3 und SAP6 (SCHALLER *et al.*, 1998). Bei einer chronischen Candidose eines HIV-Patienten wurden Transkripte von SAP1, SAP2, SAP3 und SAP6 gefunden (SCHALLER *et al.*, 1998). In einer weiteren Untersuchung des Speichels von Patienten mit akuter oraler Candidose und asymptomatischen *Candida*-Träger wurde die Expression von SAP1-7 analysiert (NAGLIK *et al.*, 1999). Sowohl bei den *Candida*-Trägern als auch bei den Patienten mit oraler Candidose wurden überwiegend SAP2 und die hyphenspezifischen Gene SAP4 bis SAP6 exprimiert. Dabei wurden Transkripte von SAP4-6 bei allen untersuchten Patienten detektiert. SAP1- und SAP3-Transkripte wurden ausschließlich bei den Patienten mit oraler Candidose beobachtet. Die Expression von SAP7 wurde in einigen Patientenproben nachgewiesen. Die zeitlichen Veränderungen in der Expression von SAP1-6 und SAP8 während einer oralen *Candida*-Schleimhautinfektion wurde an einem Modell aus rekonstruiertem menschlichen Epithelium (RHE, „**R**econstituted **H**uman **E**pithelium“) untersucht (SCHALLER *et al.*, 1998). In diesem Modell wurden SAP1 und SAP3 als erste Transkripte nach 42 Stunden Infektion detektiert. Sechs Stunden später, simultan mit der Hyphenentwicklung und Läsionen im Gewebe, wurde SAP6 exprimiert. Nach 60 Stunden Infektion wurden SAP2 und SAP8 exprimiert, während SAP4- und SAP5-Transkripte nie nachgewiesen wurden.

I.3.6. AUSWIRKUNG DER DELETIONEN DER *SAP*-GENE AUF DIE VIRULENZ VON *C. ALBICANS*

Das URA-Blaster-Protokoll (FONZI & IRWIN, 1993) wurde explizit für die gezielte Gendisruption von Genen der diploiden Hefe *C. albicans* entwickelt. Die Methode erlaubt eine sequentielle Disruption zweier Allele eines Gens (II.5.2.18.). Mittels dieser Methode wurden die Gene *SAP1*, *SAP2* und *SAP3* einzeln (Einzelmutanten) sowie die drei Gene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* nacheinander ($\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante) ausgeschaltet und die Auswirkung der Genverluste getestet (HUBE *et al.*, 1997a, SANGLARD *et al.*, 1997). Die hergestellten Mutanten zeigten ein reduziertes Wachstum im Medium mit Protein als einzige Stickstoffquelle. Besonders stark waren die $\Delta sap2$ -Einzelmutante und die $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante in ihrem Wachstum im Proteinmedium und in ihrer proteolytischen Aktivität beeinträchtigt. Bei intra venöser (i. v.) Infektion von Meerschweinchen oder Mäusen waren alle Mutanten in ihrer Virulenz abgeschwächt und die Isoenzyme Sap1p-Sap6p wurden für die Virulenz von *C. albicans* als relevant befunden (HUBE *et al.*, 1997a, SANGLARD *et al.*, 1997). Die $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - und $\Delta sap3$ -Einzelmutanten wurden weiterhin auf die Interaktion mit menschlichen Endothelzellen untersucht (IBRAHIM *et al.*, 1998). Es wurde festgestellt, dass nur Sap2p für die Schädigung der Endothelzellen und die Stimulierung der E-Selektin-Expression in diesen Zellen beteiligt ist. Keine von den untersuchten Saps trugen zur Adhärenz von *C. albicans* an Endothelzellen bei (IBRAHIM *et al.*, 1998). Von BORG-VON ZEPPELIN *et al.* (1998) wurde gezeigt, dass Sap4p-Sap6p nach der Phagozytose der Zellen von peritonealen Makrophagen vermehrt von *C. albicans* produziert wurden. Dort scheinen diese Proteasen eine wichtige Funktion für das Überleben der Pilzzellen zu haben, da im Vergleich zum Wildtypstamm die $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante 53% effektiver von Makrophagen eliminiert. Die $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ -, $\Delta sap3$ -Einzelmutanten, die $\Delta sap1/3$ -Doppelmutante und die $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante wurden ebenfalls auf dem RHE-Modell getestet (SCHALLER *et al.*, 1999). Zwar waren sie alle in der Lage, Läsionen in

Mutanten	Phänotypen	Publikationen
$\Delta sap1$	- Reduzierte Virulenz im RHE-Modell und verfrühte Expression von <i>SAP2</i> und <i>SAP8</i> <i>In vivo</i> : - Reduzierte Virulenz im Modell i. v. Infektionen - Reduzierte Virulenz im Ratten-Modell vaginaler Infektionen	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 HUBE <i>et al.</i> , 1997 DE BERNARDIS <i>et al.</i> , 1999
$\Delta sap2$	- Reduzierte Virulenz im RHE-Modell <i>In vitro</i> : - Klumpen beim Wachstum in Minimalmedium - Reduziertes Wachstum in Medium mit Protein als einzige Stickstoff-Quelle und geringere proteolytische Aktivität im Kulturüberstand - Reduzierte Fähigkeit Endothelzellen zu beschädigen und die Expression des E-Selektins zu aktivieren <i>In vivo</i> : - Reduzierte Virulenz im Modell i. v. Infektionen - Stark reduzierte Virulenz im Ratten-Modell vaginaler Infektionen	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 HUBE <i>et al.</i> , 1997 HUBE <i>et al.</i> , 1997 HUBE <i>et al.</i> , 1997 IBRAHIM <i>et al.</i> , 1998 HUBE <i>et al.</i> , 1997 DE BERNARDIS <i>et al.</i> , 1999
$\Delta sap3$	- Reduzierte Virulenz im RHE-Modell <i>In vivo</i> : - Reduzierte Virulenz im Modell i. v. Infektionen - Reduzierte Virulenz im Ratten-Modell vaginaler Infektionen	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 HUBE <i>et al.</i> , 1997 DE BERNARDIS <i>et al.</i> , 1999
$\Delta sap1 / 3$	- stark Reduzierte Virulenz im RHE-Modell - Verfrühte Expression von <i>SAP2</i> und <i>SAP8</i> und zusätzliche Expression von <i>SAP5</i> im RHE-Modell	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 SCHALLER <i>et al.</i> , 1999
$\Delta sap6$ $\Delta sap4 / 6$ $\Delta sap5 / 6$ $\Delta sap4 / 5$	<i>In vivo</i> : - Signifikant reduzierte Virulenz im Modell i. p. Infektionen	FELK <i>et al.</i> , 2002
$\Delta sap4 / 5 / 6$	<i>In vitro</i> : - Reduziertes Wachstum in Medien mit Protein als einzige Stickstoff-Quelle und geringere proteolytische Aktivität im Kulturüberstand <i>In vivo</i> : - Deutlich reduzierte Virulenz im Modell i. v. Infektionen - Signifikant reduzierte Virulenz im Modell i. p. Infektionen	SANGLARD <i>et al.</i> , 1997 SANGLARD <i>et al.</i> , 1997 KRETSCHMAR <i>et al.</i> , 1999

Tab. 2. Zusammenfassung der festgestellten Phänotypen bei den hergestellten Δsap -Mutanten. Erläuterungen siehe im Text.

der Schleimhaut zu verursachen, es wurden aber Unterschiede im Schadbild zwischen den einzelnen Mutanten registriert. So war die $\Delta sap1 / 3$ -Doppelmutante am stärksten und die $\Delta sap4 / 5 / 6$ -Dreifachmutante am wenigsten in ihrer Virulenz in diesem Modell abgeschwächt. Gleichzeitig wurde eine verfrühte bzw. zusätzliche Expression von *SAP*-Genen bei den Mutanten berichtet. Die $\Delta sap1 / 3$ -Doppelmutante exprimierte das *SAP5*-Gen, dessen Transkript vorher noch nie in dem Modell nachgewiesen wurde.

Sowohl die $\Delta sap1$ -Einzelmutante als auch die $\Delta sap1/3$ -Doppelmutante exprimierten *SAP2* und *SAP8* früher als der Wildtyp (SCHALLER *et al.*, 1999). Im vaginalen Infektionsmodell der Maus zeigten die $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - und $\Delta sap3$ -Einzelmutanten, nicht aber die $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante den stärksten Virulenzverlust (DE BERNARDIS *et al.*, 1999). Besonders beeinträchtigt war die $\Delta sap2$ -Einzelmutante, welche sich als nahezu avirulent im Modell verhielt (DE BERNARDIS *et al.*, 1999). Im Modell systemischer Mykosen nach intra peritonealer (i. p.) Infektion in der Maus wurde ein signifikanter Pathogenitätsverlust der $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante, nicht aber bei den $\Delta sap1$ -, $\Delta sap2$ - oder $\Delta sap3$ -Einzelmutanten festgestellt (KRETSCHMAR *et al.*, 1999). Die aus diesen Studien gewonnene Erkenntnisse (Zusammenfassung Tab. 2) deuten auf eine mögliche Gewebe- bzw. Infektionsspezifität der Sap-Proteasen hin.

I.4. Ziel der Arbeit

Die wichtige Bedeutung der Sap-Proteasen für die Pathogenität von *C. albicans* wurde in mehreren Studien gezeigt (Übersicht in HUBE, 2000, DE BERNARDIS *et al.*, 2001, HUBE & NAGLIK, 2001), jedoch ist die spezifische Bedeutung und Regulation einzelner Mitglieder der Genfamilie noch nicht klar. Die *SAP*-Gene bzw. die von diesen kodierten Proteasen wurden schrittweise entdeckt (HUBE *et al.*, 1991, MAGEE *et al.*, 1993, MIYASAKI *et al.*, 1994, MONOD *et al.*, 1994, 1998, FELK *et al.*, 2000). Detailkenntnisse über diese Proteasen in ihren Expressions- bzw. enzymatischen Eigenschaften sind jedoch lückenhaft. In der vorliegenden Arbeit sollte die Untersuchung des Expressionsmusters von *SAP*-Genen *in vitro* erweitert werden. Die *SAP*-Expression sollte in *C. albicans*-Zellkulturen und Modellen untersucht werden, bei denen die Zellen unterschiedliche Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Dazu gehört Wachstum in Medium mit Protein als einzige Stickstoffquelle, Wachstum im Minimalmedium supplementiert mit Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle, Morphologiewechsel induzierende Bedingungen und

Bedingungen, die das phänotypische „Switching“ beeinflussen. Das Bild des Expressionsmusters aller SAPs sollte mit *in vivo* Untersuchungen in Maus-Modellen systemischer Mykosen nach i. p. Infektion und infiziertem Oesophagus nach oraler Infektion vervollständigt werden. Dafür sollte eine Methode für den direkten Nachweis von *Candida*-mRNA in infiziertem Gewebe etabliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte das vermutlich letzte Mitglied der SAP-Familie, *SAP10* vollständig sequenziert und charakterisiert werden. Die Proteine Sap9p und Sap10p unterscheiden sich von den anderen sekretorischen Aspartat-Proteasen vermutlich dadurch, dass sie zu den Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankerten Proteinen gehören und nicht sezerniert werden, sondern in der Zellwand verankert bleiben (MONOD *et al.*, 1998, FELK *et al.*, 2000). Beide Proteasen sind bisher kaum untersucht und es wird aufgrund ihrer Struktur vermutet, dass sich ihr Funktion von den bisher bekannten Saps unterscheidet. Die Gene für die beiden Proteasen sollten ausgeschaltet werden und die hergestellten $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Mutanten auf Phänotypen hin untersucht werden. Im Rahmen der Funktionsanalyse von Sap9p und Sap10p sollte die Untersuchung auf die Proteineigenschaften beider Proteasen ausgeweitet werden.