

**III.**

**ERGEBNISSE**

---

## III.1 UNTERSUCHUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS DER *SAP*-GENFAMILIE

Die von zehn Genen kodierten Sap-Proteasen werden als Virulenzfaktor von dem opportunistischen Pilz *C. albicans* diskutiert. Einer der wichtigen Aspekte für das Verständnis der Funktion dieser Genefamilie ist die Untersuchung des Expressionsmusters. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Transkriptionsnachweis von *SAP1-6* und *SAP8-10* in einem einfacheren *in vitro* System (III.1.1.) untersucht. Hier sind die Wachstumsbedingungen des Pilzes definierter als in einer *in vivo* Situation, so dass sich der Einfluss einzelner Umweltfaktoren auf die Genexpression besser verstehen lässt. Dieses System spiegelt aber keine komplexeren Interaktionen zwischen dem Pilz und dem Wirtsorganismus wieder. Deshalb wurde im zweiten Abschnitt das Expressionsmuster von allen zehn *SAP*-Genen in einem *in vivo* Infektionssystem (III.1.2.) untersucht. In den beiden Systemen wurde die Transkriptionsstärke mit der RT-PCR-Technik untersucht, die im Vergleich zu anderen vergleichbaren Techniken, wie z. B. Northern-Blot-Analyse, viel sensitiver ist und bei der sich die Expression auch sehr ähnlicher Gene unterscheiden lässt.

### III.1.1. EXPRESSION DER *SAP*-GENFAMILIE *IN VITRO*

#### III.1.1.1. DIE TRANSKRIPTION VON *SAP*-GENEN KANN VON VIELEN UMGEBUNGSFAKTOREN BEEINFLUSST WERDEN

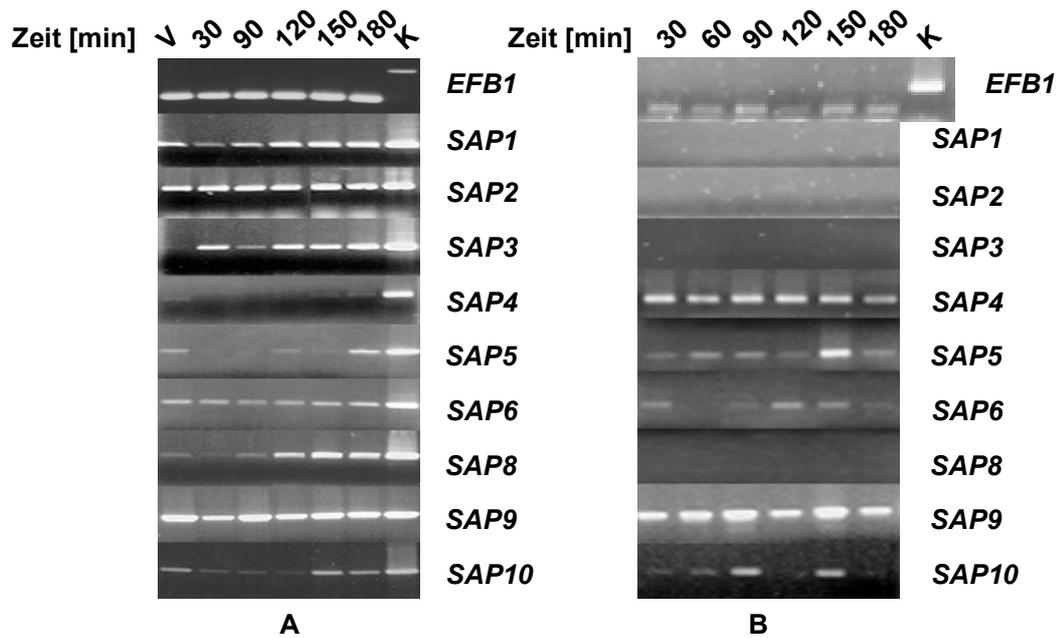
Es wurde die Expression der *SAP*-Gene unter mehreren *in vitro* Bedingungen untersucht, die Teilaspekten einer natürlichen Umgebung von *C. albicans* entsprechen könnten und gleichzeitig die Virulenzfaktoren zur Entfaltung bringen. Dazu gehören Bedingungen, die den Wechsel von der Hefeform zum Myzel induzieren (I.1.1.1.1.). Medien mit jeweils Protein und Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle wurden untersucht (I.1.1.1.2.,

I.1.1.1.3.), da die Sekretion von Sap-Proteasen für die Beschaffung von Peptiden und Aminosäuren in einer stickstoffmangelnden Umgebung als notwendig erachtet wird (STAIB, 1965). Als einen Mechanismus zur Anpassung an eine dynamische Umwelt hat der Pilz im Laufe der Evolution die Fähigkeit entwickelt, den Phänotyp spontan zu wechseln. Diesen Veränderungen - „phänotypisches Switching“ - wurden zuerst anhand der veränderten Kolonie- bzw. Zellform beobachtet (SOLL *et al.*, 1987, SUZUKI *et al.*, 1989). Dabei erfolgen aber auch eine Reihe biochemischer und morphologischer Veränderungen, die auch einen Einfluss auf die Expression von SAP-Genen haben könnten. Deshalb wurde das Expressionsmuster von SAP-Genen während des phänotypischen Wechsels untersucht (I.1.1.1.4.).

#### **III.1.1.1.1. DAS EXPRESSIONSMUSTER DER SAP-GENE UNTERSCHIEDET SICH BEI MYZELINDUKTION IN VERSCHIEDENEN MEDIEN**

Die Induktion der Myzelbildung wurde in dieser Arbeit in Lee's- pH 6,5 und 5%igem FCS-Medien (II.2.) durchgeführt (II.4.3.). In den bisher unter vergleichbaren Bedingungen (10% Serum, 10% Serum im Lee's-Medium, Lee's-Medium, pH 6,5) durchgeführten Studien wurde eine Expression von SAP4-6 zwei Stunden nach Myzelinduktion beobachtet, die drei Stunden später nicht mehr nachweisbar war (WHITE & AGABIAN, 1995). Als Haupttranskript beim Hefe-Myzel-Übergang wurde mittels SI-Nuklease-Assay SAP6 detektiert. Weniger starke Signale wurden für SAP5- und keine Signale für SAP4-Transkript unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen (WHITE & AGABIAN, 1995). HUBE *et al.* (1994) berichteten über die Induktion der Expression von SAP4-6 und Ausbleiben der Expression von SAP2 in 5%igem Serum. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression dieser Gene bei höheren pH-Werten aktiviert und von Aminosäuren nicht gehemmt wird.

Sowohl die Erhöhung der Temperatur auf 37°C und die Erhöhung des pH-Wertes auf pH 6,5, als auch der Zusatz von Serum induziert die *Candida*-Zellen zur Hyphenbildung. Zu den Zeitpunkten 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min nach der Induktion waren im Lee's-Medium 14%, 38%, 58%, 63%,



**Abb. 3. Expression von SAPs im SC5314-Wildtypstamm von *C. albicans* in Lee's- (A) und 5% FCS- (B) Medien.**

Mögliche Verunreinigungen der hergestellten cDNA mit genomischer DNA wurden mit den spezifischen *EFB1*-Primern kontrolliert. Für die *EFB1*-Kontroll-PCR wurde 1 µl cDNA eingesetzt, die in 35 Zyklen amplifiziert wurde. Die reine cDNA ergab 554 bp lange Amplifikate. Das Gen *EFB1* beinhaltet ein Intron und die Amplifikation der genomischen DNA (K) ergab ein längeres Produkt von 918 bp. In der SAP-spezifischen PCR wurden 2 µl cDNA eingesetzt, die innerhalb von 40 Zyklen amplifiziert wurde. In den Kontroll-PCR-Ansätzen (K) mit genomischer DNA wurden jeweils 125 ng DNA eingesetzt. Für die Expressionsanalyse von SAP-Genen im Lee's-Medium wurde auch die Vorkultur (V) untersucht.

81% und 94% und im 5%igen FCS-Medium entsprechend 43%, 62%, 75%, 83%, 95% und 99% der Zellen in der Hyphenform nachzuweisen. Zwar stimulieren beide Medien den gleichen Vorgang – die Myzelbildung - wirkten sich aber unterschiedlich auf die Expression von SAP-Genen aus. So wurden im 5%igen FCS keine Transkripte von *SAP1-3* und *SAP8* detektiert (Abb. 3B), während sie im Lee's-Medium nachgewiesen wurden (Abb. 3A). In der ersten Spur des Gels in der Abbildung 3A sind die RT-PCR-Amplifikate aus der Vorkultur aufgetragen worden, in der die Zellen sich in der stationären Phase befanden und ausschließlich in der Hefeform vorlagen. Es ist ersichtlich, dass im Lee's-Medium *SAP8* und *SAP10* im Laufe der Myzelbildung zunehmend, sowie *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP6* und *SAP9* zu

allen untersuchten Zeitpunkten transkribiert wurden. Besonders interessant ist die Regulation der Expression von *SAP4-6*, welche unterschiedliche Expressionsmuster in den beiden Medien aufweisen. Während im Lee's-Medium *SAP6* zu allen untersuchten Zeitpunkten stark und *SAP4* nur in den späteren Induktionsstadien schwach exprimiert wurde, wurde im 5%igen FCS-Medium umgekehrt *SAP4* stark und zu allen Zeitpunkten exprimiert. *SAP5*-Transkripte wurden im Lee's-Medium nur schwach und unregelmäßig, im 5%igen FCS-Medium zu allen Zeitpunkten exprimiert.

#### **III.1.1.1.2. PROTEIN ALS EINZIGE STICKSTOFFQUELLE FÖRDERT DIE EXPRESSION DER *SAP*-GENE**

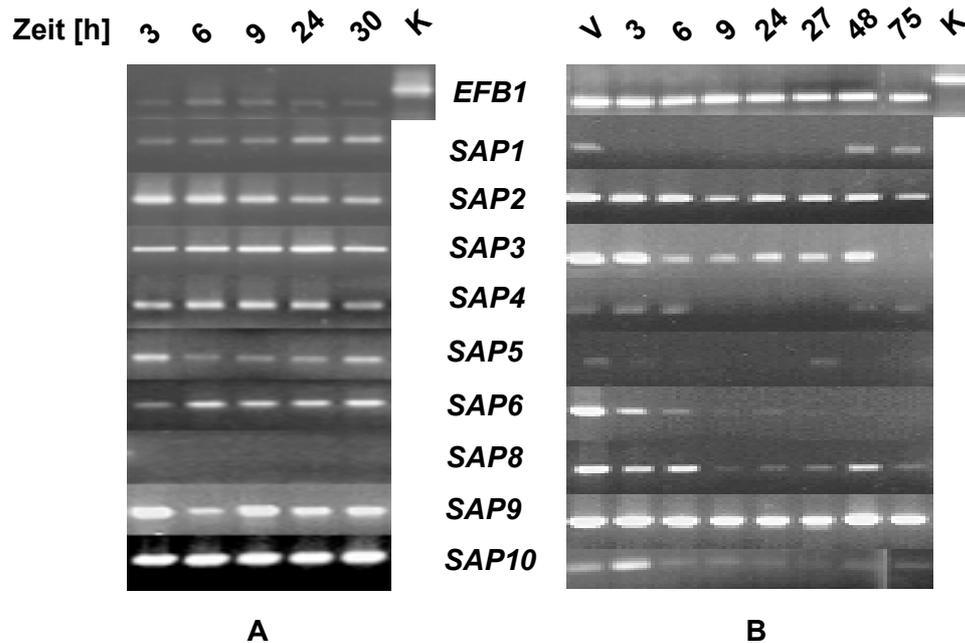
REMOLD *et al.* (1968) stellten fest, dass beim Wachstum von *C. albicans* in Minimalmedium mit BSA als einziger Stickstoff-Quelle die proteolytische Aktivität im Kulturüberstand stieg. Bei genaueren Untersuchungen erwies sich die *SAP2* mRNA als dominantes Transkript bei den meisten untersuchten Stämmen (HUBE *et al.*, 1994, WHITE & AGABIAN, 1995). Die Expression von *SAP8* wurde hauptsächlich beim Wachstum bei 25°C festgestellt und war in den Hefe- bzw. Hyphenzellen beim Wachstum bei 37°C nur schwach nachzuweisen (HUBE, 1996). Es stellte sich die Frage, wie die Expression der übrigen zehn bekannten *SAP*-Gene in Anwesenheit des BSA als einziger Stickstoffquelle induziert wird.

Die Detektion der *SAP*-Transkripten wurde zu den Zeitpunkten 3, 6, 9, 24 und 30 Stunden nach dem Beimpfen der Hauptkultur (II.4.2.) durchgeführt. In BSA-haltigem Medium (II.2.) konnte die Transkription aller untersuchten *SAP*-Genen, ausgenommen *SAP8*, beobachtet werden (Abb. 4A). Dabei war das Expressionsniveau aller *SAP*-Gene im Proteinmedium zu allen untersuchten Zeitpunkten sehr hoch.

#### **III.1.1.1.3. AMMONIUMSULFAT ALS EINZIGE STICKSTOFFQUELLE VERÄNDERT DIE *SAP*-EXPRESSION**

Die Anwesenheit von Protein als einzige Stickstoffquelle im Medium induziert in *C. albicans* stark die Transkription der meisten *SAP*-Gene (III.1.1.1.2.).

Dagegen reduzierte die Zugabe von Ammonium-Salze in das Proteasen-induzierende Medium die Sekretion von Sap-Proteasen (BANERJEE *et al.*, 1991, WHITE & AGABIAN, 1995). CRANDALL & EDWARDS (1987) beobachteten keine Stimulation der Protease-Produktion unter stickstoffmangelnden Bedingungen.



**Abb. 4. Expression der SAP-Gene in SC5314 beim Wachstum in YCB / BSA-Medium (A) und YCB /  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Medium (B).**

(A) Die aus 2  $\mu\text{g}$  RNA hergestellte cDNA wurde sowohl in der *EFB1*-Kontroll- als auch in der PCR mit *SAP*-spezifischen Primer mit 35 Zyklen amplifiziert. In alle PCR-Ansätze wurde 1  $\mu\text{l}$  von der cDNA hinzugegeben. Bei der *EFB1*-Kontroll-PCR war die Größe des amplifizierten cDNA-Fragmentes gleich 554 bp und des genomischen DNA-Fragmentes (K) gleich 918 bp.

(B) Die cDNA wurde aus 0,5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA synthetisiert, die aus *Candida*-Zellen der Vorkultur (V) sowie Hauptkultur nach 3, 6, 9, 24, 27, 48 und 75 Stunden Inkubation extrahiert wurde. Von der hergestellten cDNA wurde 1  $\mu\text{l}$  sowohl für die *EFB1*-Kontroll- als auch für die *SAP*-spezifische PCR eingesetzt. In allen Kontroll-PCR-Ansätzen mit genomischer DNA (K) wurden 125 ng DNA eingesetzt. Die *EFB1*-Fragmente wurden in 35 Zyklen und die *SAP*-Fragmente in 40 Zyklen amplifiziert.

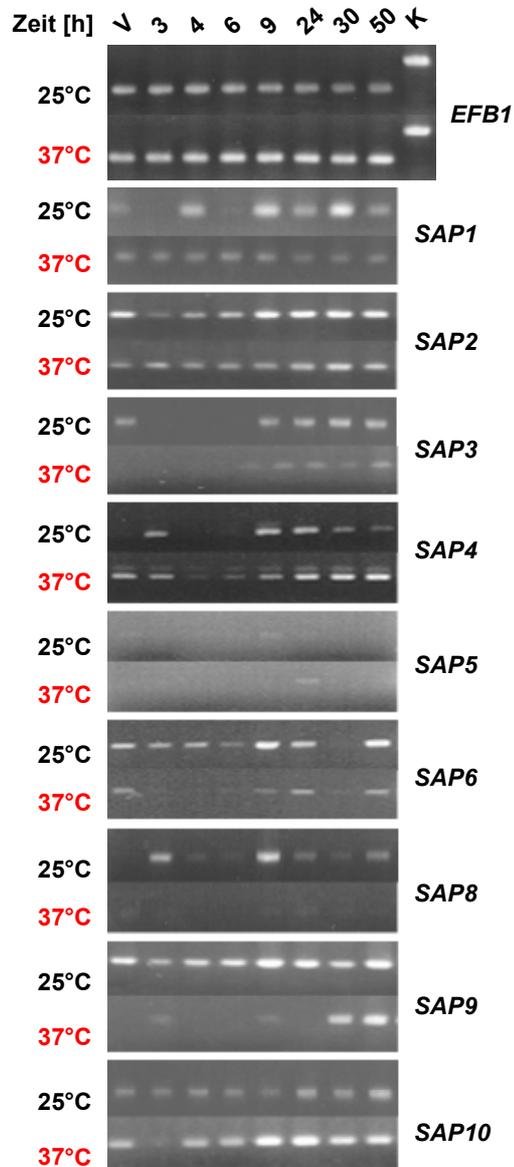
Um zu untersuchen, ob *SAP*-Gene unter diesen Bedingungen reprimiert werden, wurde in diesem Experiment eine Zellkultur in YCB-Minimalmedium mit Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) supplementiert (II.2., II.4.2.). Die Expression der *SAP*-Gene wurde nach 3, 6, 9, 24, 27, 48 und 75 Stunden

Inkubation, sowie in der Vorkultur untersucht (Abb. 4B). Unter diesen Bedingungen war die Expression vor allem zweier Gene, *SAP2* und *SAP9*, zu allen Zeitpunkten stark. Das Protease-Gen *SAP3* wurde in den ersten 48 Stunden stark exprimiert, war aber nach 75 Stunden nicht mehr nachweisbar. Das Protease-Gen *SAP10* wurde in allen Proben gleichmäßig auf einem niedrigen Niveau exprimiert. Die Transkripte der anderen *SAP*-Gene wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachgewiesen und ergaben ebenfalls schwache Signale. Die Expression von *SAP6* und *SAP8* wurde langsam inaktiviert. Transkripte von *SAP4* waren schwach zu frühen und späten Zeitpunkten detektierbar. Alle *SAP*-Transkripte waren in der YPG-Vorkultur stärker als in der YCB /  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Hauptkultur präsent. Das Gen *SAP1* war zu späteren Inkubationszeiten leicht exprimiert. Transkripte von *SAP5* wurden nur nach 27 Stunden einmal nachgewiesen. Im Vergleich zum Wachstum von *C. albicans* in Minimalmedium mit BSA waren im Minimalmedium mit Ammoniumsulfat alle *SAP*-Transkripte zumindest zu einem Zeitpunkt nachweisbar, obwohl die meisten *SAP*-Gene auf einem minimalen Transkriptionsniveau exprimiert wurden und bei vielen Zeitpunkten nicht mehr detektierbar waren (Abb. 4).

#### III.1.1.1.4. REGULATION DER *SAP*-EXPRESSION BEIM „SWITCHING“

Phänotypisches „Switching“ von *C. albicans* ist besonders gut bei dem Stamm WO-I (II.1.) zu beobachten. Während des Wachstums dieses Stammes bei unterschiedlichen Temperaturen werden unterschiedliche charakteristische Zellformen gebildet. Niedrige Temperaturen von ca. 25°C stabilisieren die sogenannte „opaque“ Form. Diese Zellen weisen eine ovale Form auf. Bei höheren Temperaturen wie 37°C wird die Bildung der sogenannten „white“ Zellform begünstigt, die rund und kleiner als „opaque“ Zellen sind. Die Kolonien verschiedener Zelltypen lassen sich auch optisch auf Festmedien zu unterscheiden. Die „white“ Kolonien sind sehr hell und eher weißlich, während die „opaque“ Kolonien beige gefärbt sind. Die Zellsuspension des WO-I-Stammes wurde auf YPG-Festmedium (II.2.) ausgestrichen. Die Zellen wurden auf den gewünschten Zelltyp bei 25°C oder

bei 37°C über mehrere Tage selektiert. Von den gewachsenen Einzelkolonien, die dem „white“ oder dem „opaque“ Typ entsprachen, wurden



**Abb. 5. Expression der SAP-Gene im WO-I „Switching“-Stamm von *C. albicans* in YCB / BSA-Medium.**

Die Zellen wurden aus den Vorkulturen bei 25°C und 37°C sowie aus den entsprechenden Hauptkulturen nach 3, 4, 6, 9, 24, 30, und 50 Stunden Inkubation aufgearbeitet. Jeweils 1 µg isolierten Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die darauf folgende PCR wurde mit 1 µl cDNA und die Kontroll-PCR (K) mit 125 ng genomischer DNA durchgeführt. Die *EFB1*-Produkte wurden in den 35 Zyklen und die *SAP*-Produkte in den 40 Zyklen amplifiziert.

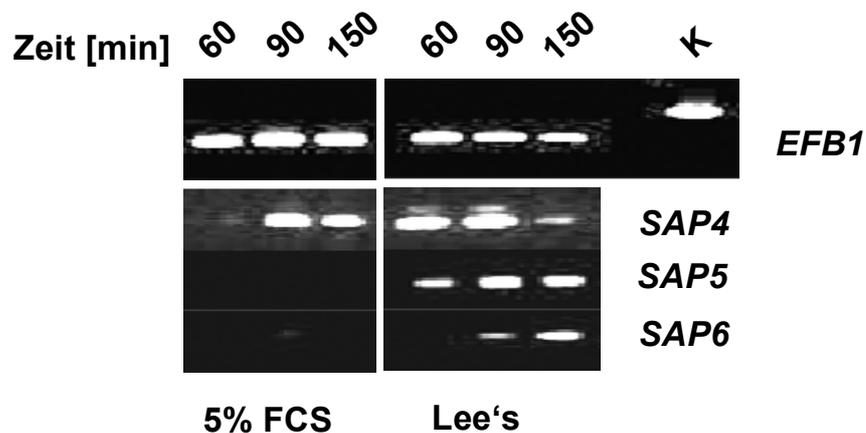
Vorkulturen angeimpft. Die Flüssig-Hauptkulturen wurden ebenso wie die Vorkulturen in YCB / BSA-Medium (II.2.) bei 25°C für die „opaque“ Zellform bzw. bei 37°C für die „white“ Zellform inkubiert. Zu den Zeitpunkten 3, 4, 6, 9, 24, 30 und 50 Stunden nach dem Animpfen der Hauptkulturen wurde die Expression von *SAPs* und der Anteil der Zelltypen bestimmt (Abb. 5).

Wie beim SC5314-Stamm (I.1.1.1.2.) wurden die meisten Transkripte für SAPs im WO-I-Stamm im BSA-haltigen Medium gefunden. Sie werden bei diesem „Switching“-Stamm aber einer stärkeren Regulation unterworfen. Stark und gleichmäßig waren in den „opaque“ Zellen *SAP2*, *SAP9* und *SAP10*, sowie in den „white“ Zellen *SAP2* und *SAP10* exprimiert. Transkripte von *SAP4* waren in der „white“ Form zu allen Zeitpunkten nachweisbar. Zu einer späteren Transkription kam es nach etwa 9 Stunden bei *SAP3*, *SAP4* in der „opaque“ und *SAP3*, *SAP6* in der „white“ Form, sowie nach 30 Stunden *SAP9* in der „white“ Form. Am wenigsten wurde *SAP5* unter beiden Bedingungen und *SAP8* bei 37°C exprimiert. Auch waren nicht in allen Vorkulturen alle SAP-Gene exprimiert. Die Expression von *SAP4* und *SAP8* fehlte in der „opaque“ Vorkultur und die von *SAP3*, *SAP5*, *SAP8* und *SAP9* fehlte in der „white“ Vorkultur. Die Expression von *SAP1*, *SAP3*, *SAP6*, *SAP8* und *SAP9* in den „white“ Zellen war generell schwächer als in den „opaque“ Zellen.

#### **III.1.1.2. SAP4-6 WERDEN VON EINER HYPHENDEFIZIENTEN $\Delta EFG1 / \Delta CPH1$ - MUTANTE IM MYZELINDUZIERENDEN MEDIUM EXPRIMIERT**

Die komplexe Regulation der Genexpression von *C. albicans* wird nicht nur durch Umweltfaktoren bedingt, sondern kann auch stark von intrazellulären Regulationspassagen abhängen. Vielfältige Umweltsignale beeinflussen den Morphologiewechsel bei *C. albicans*, der über mehrere Signalkaskaden reguliert wird (ERNST, 2000). Cph1p und Efg1p sind Transkriptionsfaktoren, die am Ende dieser Signalkaskaden stehen und die Ausbildung von Hyphen regulieren (STOLDT *et al.*, 1997). Durch die Signalkaskaden werden auch andere Vorgänge in der Zelle reguliert. Im Zusammenhang mit dem Morphologiewechsel wurde die Expression von *SAP4-6* festgestellt (HUBE *et al.*, 1994). Es stellte sich die Frage, inwieweit eine  $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Doppelmutante, welche nicht mehr in der Lage ist Hyphen zu entwickeln (LO *et al.*, 1997), noch die hyphenspezifischen Gene *SAP4-6* exprimiert?

Der  $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Mutantenstamm (II.1.) wurde im Vergleich zum SC5314-Wildtypstamm in hypheninduzierenden Lee's- und 5%igen FCS-Medien (II.2., II.4.3.) auf die Expression von *SAP4-6* untersucht. Das Expressionsmuster des Wildtypstammes entsprach den früheren Untersuchungen (III.1.1.1.). Beim Wachstum des Mutantenstammes in den myzelinduzierenden Medien wurden vermehrt Hefe-Zellen und Pseudomyzel jedoch kein echtes Myzel gebildet. Im Gegensatz zum Wildtypstamm (Abb. 3) zeigte die  $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Mutante (Abb. 6) eine starke Expression von *SAP4* in beiden Medien. Die *SAP5*-Transkripte wurden im 5%igen FCS-Medium gar nicht und *SAP6*-Transkripte nur in Spuren nachgewiesen. Im Lee's-Medium wurde statt einer starken, gleichmäßigen Expression, wie beim Wildtypstamm, eine spätere Aktivierung des *SAP6*-Gens festgestellt. Grundsätzlich war die Transkription von *SAP4-6* in der  $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Mutante nachweisbar, jedoch hatte die Deletion der beiden Transkriptionsfaktorgene eine Auswirkung auf die Expressionsstärke der einzelnen Gene der *SAP4-6*-Subfamilie. Am stärksten war die Expression von *SAP5* und *SAP6* im Serum-Medium abgeschwächt.



**Abb. 6. Expression von *SAP4-6* im myzeldefizienten  $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Mutantenstamm von *C. albicans* in Lee's- und 5%igem FCS-Medium.**

Die Hauptkultur wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 1,5 ml Zellsuspension entnommen. Für die Herstellung der cDNA wurden 200 ng isolierter Gesamt-RNA eingesetzt, wovon 1  $\mu$ l für die *EFB1*-Kontroll-PCR mit 35 Zyklen und 2  $\mu$ l für den *SAP*-Nachweis mit 40 Zyklen eingesetzt wurden. Die Kontroll-PCR (K) wurde mit 125 ng genomischer DNA durchgeführt.

### III.1.2. EXPRESSION VON *SAPs* *IN VIVO* UND DEREN BEDEUTUNG BEI *CANDIDA*-INFEKTIONEN

Nachdem das Expressionsmuster *in vitro* unter mehreren Konditionen untersucht worden war, war es auch wichtig das Expressionsmuster in einem *in vivo* Modell zu erforschen. *Candida*-Infektionen lassen sich in vier Stufen

Name des Gens	Lokalisation		Primer-Sequenz ( 5'--->3' )	Schmelz- Temperatur	Fragment- Größe
		Abstand vom START-Kodon			
<b>SAP1</b>	5'	291-313 bp	TACTTGTGATAAACCTCGTCCTG	58,9°C	831 bp
	3'	1099-1122 bp	ATCATCATCCAAATCATAACAAG	54,2°C	
<b>SAP2</b>	5'	331-355 bp	GTTGATTGTCAAGTCACTTATAGTG	56,1°C	898 bp
	3'	1205-1229 bp	TCTTAGGTCAAGGCAGAAATCTGG	59,3°C	
<b>SAP3</b>	5'	374-399 bp	CAAGTCTTCAAGTAGTTCTCAAAT	56,9°C	826 bp
	3'	1178-1200 bp	CCCTAAGTAAGAGCAGCAATGT	58,4°C	
<b>SAP4</b>	5'	521-540 bp	CCGTTGGTATTGGTGGTGTT	57,3°C	532 bp
	3'	1035-1053 bp	AGGAACGGAAATCTTGAGG	54,5°C	
<b>SAP5</b>	5'	192-214 bp	CGATGAGACTGGTAGAGATGGTG	62,4°C	870 bp
	3'	1043-1062 bp	TTCGGAAACAGGAACGGAG	56,7°C	
<b>SAP6</b>	5'	614-635 bp	AAACCAACGAAGCTACCAGAAC	58,4°C	605 bp
	3'	1197-1219 bp	TAAGTCTGAGCCATGGAGATTTTC	57,1°C	
<b>SAP7</b>	5'	558-578 bp	TCTTCTCACTGGAAGCTGC	57,3°C	1199 bp
	3'	1736-1757 bp	AGGAACAACGGCATGGTTATC	57,9°C	
<b>SAP8</b>	5'	58-78 bp	TGGCTCAAGGTCTTGCTATC	54,0°C	1163 bp
	3'	1198-1221 bp	CTCTATAAAGTAGAAATACTTGA	51,7°C	
<b>SAP9</b>	5'	896-913 bp	CTCAATACTGCCGATGC	50,8°C	738 bp
	3'	1612-1634 bp	TAAACCAAACATAGTAGGATA	52,8°C	
<b>SAP10</b>	5'	548-569 bp	GATCTGCTGCTCAAGGTGTATG	60,3°C	437 bp
	3'	966-985 bp	AAGAGTGGCCAAGAGCATCA	57,3°C	

Tab. 11. Primer zur Expressionsanalyse von *SAP*-Genen *in vivo*.

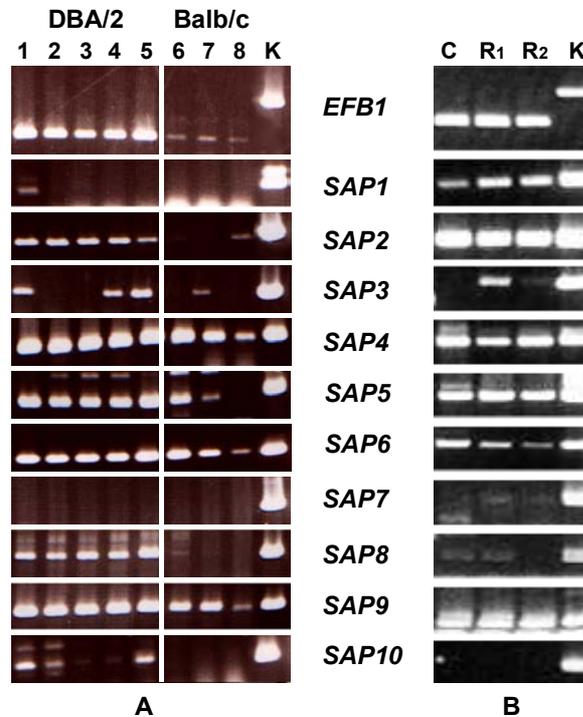
einteilen (ODDS, 1994a): (1) eine Besiedlung der Hornhaut bzw. Schleimhaut, (2) eine oberflächliche, (3) eine tiefe und (4) eine systemische Mykose. Die Besiedlung von *C. albicans* der Wirtsoberflächen verläuft asymptomatisch. Im Fall oberflächlicher Mykosen werden die obersten Schichten der Hornhaut bzw. Schleimhaut von sich teilenden *Candida*-Zellen befallen. Im Fall einer tiefen Kandidose disseminieren die Zellen in die tieferen Gewebsschichten und dringen ins Kreislaufsystem. Bei systemischen Mykosen adhären *Candida*-Zellen an Endothelzellen, entwickeln lange Hyphen, mit deren Hilfe sie das Endothel der Blutgefäße durchbrechen und in das Organgewebe eindringen können. Als Folge disseminiert der Pilz über den ganzen Körper. In den *in vivo* Untersuchungen in dieser Arbeit wurden zwei Infektionsstadien - oberflächliche und systemische Infektionen - differenziert. Für die oberflächlichen Infektionen wurden orale Infektionen (III.1.2.1.) und für systemische Mykosen i. p. Infektionen in Maus-Modellen gewählt (III.1.2.2.).

Für die Expressionsanalyse von *SAPs in vivo* wurden neue Primerpaare ausgesucht, die besser aufeinander abgestimmt waren. Die Sequenzen, Schmelztemperaturen von den entworfenen Primer, sowie die Größen der Amplifikate sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

#### **III.1.2.1. EXPRESSIONSMUSTER VON *SAP*-GENEN WÄHREND OBERFLÄCHLICHER INFESTIONEN VON *C. ALBICANS***

Mit *C. albicans* Stamm SC5314 oral infizierte Mäuse wurden auf die Expression von *SAP*-Genen untersucht. Aus infizierten Tieren präpariertes Oesophagus-Gewebe und die als Cardia bezeichnete Einmündungsstelle des Oesophagus in den Magen wurden für eine RT-PCR-Analyse eingesetzt. Für dieses Infektions-Modell (II.4.4.) wurden zwei Mäusestämme, DBA/2 und Balb/c, verwendet, die sich unterschiedlich gegenüber *Candida*-Infektionen verhalten. In den weniger widerstandsfähigen, Komplementfaktor fünf (C5) defizienten DBA/2-Mäusen kommt es zu einer viel stärkeren Proliferation der *Candida*-Zellen als bei Balb/c-Mäusen (M. KRETSCHMAR & T. NICHTERLEIN,

persönliche Mitteilung). Es wurde fünf Organe von DBA/2- und drei von Balb/c-Mäusen auf die Expression von *SAP*-Gene untersucht.



**Abb. 7. Expression der *SAP*-Gene während einer oralen Kandidose bei DBA/2- und Balb/c- Mäusen (A) und im RHE-Modell (B).**

Das Expressionsprofil von *SAP*-Genen wurde im Oesophagus und Cardia oral infizierter DBA/2- (Spur 1-5) und Balb/c- (Spur 6-8) Mäusen untersucht (A). Die Organe wogen 60-80 mg und waren nach viertägiger Infektion mit ca. 25.000 bis 365.000 (DBA/2) und 3.360 bis 90.000 (Balb/c) cfu / 100 mg infiziert. Für die Herstellung der cDNA wurden 30 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In der *EFB1*-PCR und *SAP*-PCR mit entsprechend 35 und 40 Zyklen wurden jeweils 0,6 µl und 1,2 µl aufgereinigter cDNA eingesetzt. Zum Vergleich wurde infizierter Cardia ohne Oesophagus (C) einer Balb/c-Maus und ein infiziertes orales Schleimhautmodell nach 36 Stunden (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>) auf die *SAP*-Expression untersucht (B). Die Kontroll-PCR (K) wurden mit 125 ng genomischer DNA durchgeführt.

Die Expressionsanalyse mittels RT-PCR (Abb. 7) zeigte, dass *SAP7* in keinem der untersuchten Organen exprimiert wurde. Auch *SAP1*-, *SAP3*- und *SAP10*-Transkripte waren in diesem Modell selten vertreten. Die Expression von *SAP2*, *SAP5* und *SAP8* war in der DBA/2-Mäuse in allen Organen stark ausgeprägt, nicht aber in der Balb/c-Mäuse, wo sie entweder schwach oder gar nicht nachweisbar war. Am stärksten waren die Signale für *SAP4-6* und *SAP9* in beiden Mausstämmen.

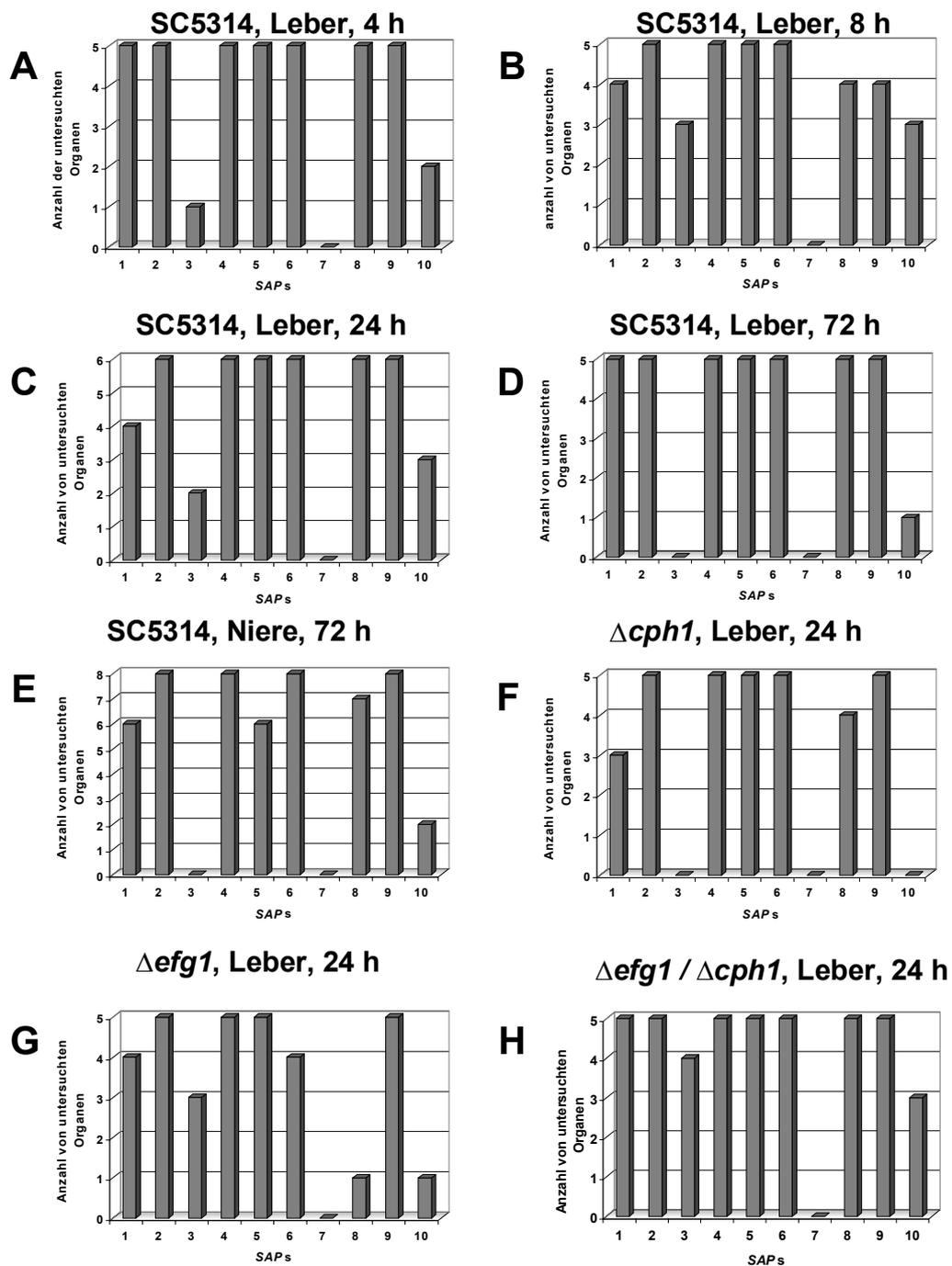
Oesophagus und Cardia sind bei Mäusen von einem verhornten mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Die Einmündung des Cardia in den Antrum stellt einen Grenzbereich dar, wo das verhornte mehrschichtige Plattenepithel in das mehrschichtige Zylinderepithel übergeht. Die histologische Grenzbereiche sind sehr verletzlich und können im Fall einer Infektion als eine Invasionsstelle dienen (M. KRETSCHMAR, persönliche Mitteilung). In einem Fall wurde lediglich der mit *Candida*-Zellen infizierte Cardia-Teil vom Oesophagus einer Balb/c-Maus entfernt und auf die *SAP*-Expression getestet (Abb. 7B), um zu sehen ob sich das Expressionsmuster an einem Invasionsort ändert. Dabei waren Transkripte für *SAP3*, *SAP7* und *SAP10*, wie in den meisten untersuchten Oesophagen mit Cardia, nicht nachweisbar.

In einem RHE-Modell für oralen Kandidosen (I.3.5., II.4.4.), das auf einer Gewebekultur aus oralen Epithelzellen beruht, wurde das Expressionsverhalten von *SAP1-10* in *C. albicans* untersucht. Dabei wurden die Transkripte von *SAP1*, *SAP2*, *SAP4-6* und *SAP9* 36 Stunden nach Beginn der Infektion sehr deutlich nachgewiesen. Die Expression von *SAP10* war nicht nachweisbar, die von *SAP7* und *SAP8* nur schwach und von *SAP3* unregelmäßig. Histologisch ist zu diesem Zeitpunkt eine erste Erosion mit Ödem- und Vakuolenbildung sowie Akantholyse einzelner Keratinozyten der Schleimhaut (SCHALLER *et al.*, 1998 & 1999) sichtbar. Generell war die Expression von *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP9* und *SAP10* im RHE-Modell ähnlich wie bei der Oesophagus-Infektion (Abb. 7).

### III.1.2.2. EXPRESSIONSDYNAMIK DER *SAP*-GENE BEI SYSTEMISCHEN MYKOSEN

Systemische Mykosen von *C. albicans* sowie das damit verbundene Expressionsprofil von *SAP*-Genen wurden in einem i. p. Modell bei Mäusen untersucht. Die *Candida*-Zellsuspensionen wurde dabei in die Bauchhöhle einer Maus gespritzt, so dass der Pilz die peritoneal liegenden Organe wie Leber, Pankreas und Milz befiel (II.4.4.). Um eine dynamische Entwicklung systemischer Mykosen zu beobachten, wurde das Expressionsmuster der

*SAP*-Gene zu mehreren Zeitpunkten untersucht, die den unterschiedlichen Invasionsstadien von *C. albicans* entsprachen. Nach 4 Stunden Infektion adhärten sich die Zellen an die Organoberflächen. Nur vereinzelt bildeten sie Hyphen, die nach 8 Stunden vermehrt die Organkapsel durchbrachen und in die Organe eindrangen. Eine massive Invasion des Pilzes wurde nach 24 Stunden beobachtet. Dabei penetrierten *Candida*-Zellen in die Blutbahn und disseminierten im ganzen Körper der Maus. Zweiundsiebzig Stunden nach der i. p. Infektion war der Pilz in den peripheren Organen, wie Muskeln, Herz, Hirn und Niere zu finden und rief sekundäre Infektionsherde hervor (M. KRETSCHMAR, persönliche Mitteilung). Zu den genannten Zeitpunkten wurden infizierte Organe entnommen (II.4.4.) und auf die Expression von *SAPs* hin analysiert. Für die Expressionsuntersuchung der *SAP*-Gene in den infizierten Organen wurde die RNA-Aufreinigung aus infizierten Organen etabliert und die RT-PCR optimiert (II.5.1.2., II.5.1.7.). Als Testorgane wurden für die Untersuchung primärer i. p. Infektionen mit *C. albicans*-Stamm SC5314 die Leber und für sekundäre Infektionen die Niere gewählt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in der Abbildung 8 zusammengestellt worden. Zu denjenigen *SAP*-Genen, die während der i. p. Infektion in allen untersuchten Organen und in allen untersuchten Infektionsstadien exprimiert waren, gehörten *SAP2*, *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* (Abb. 8A-8D). Dagegen wurde eine leichte Regulation von *SAP1*, *SAP3*, *SAP8* und *SAP10* beobachtet, da die Signale für diese mRNA nicht in allen untersuchten Organen detektiert wurden. Die Transkripte von *SAP3* und *SAP10* wurden deutlich zu dem Zeitpunkt der Invasion (8 Stunden) von *C. albicans* in die Leber nachgewiesen, waren aber in dem späteren Stadium (72 Stunden) sowohl in der Leber als auch bei der sekundären Infektion der Niere nicht mehr detektierbar. Die Expression des *SAP3*-Gens war zu diesem Zeitpunkt (72 Stunden) in keinem der beiden Organe nachweisbar. Dagegen war die Expressionsintensität von *SAP1* nach 72 Stunden Infektion in der Leber am höchsten. Die Transkription des *SAP8*-Gens erreichte die maximale Aktivität 24 Stunden nach der Infektionsinitiation und klangt später wieder leicht ab. *SAP7*-Transkripte wurden in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen.

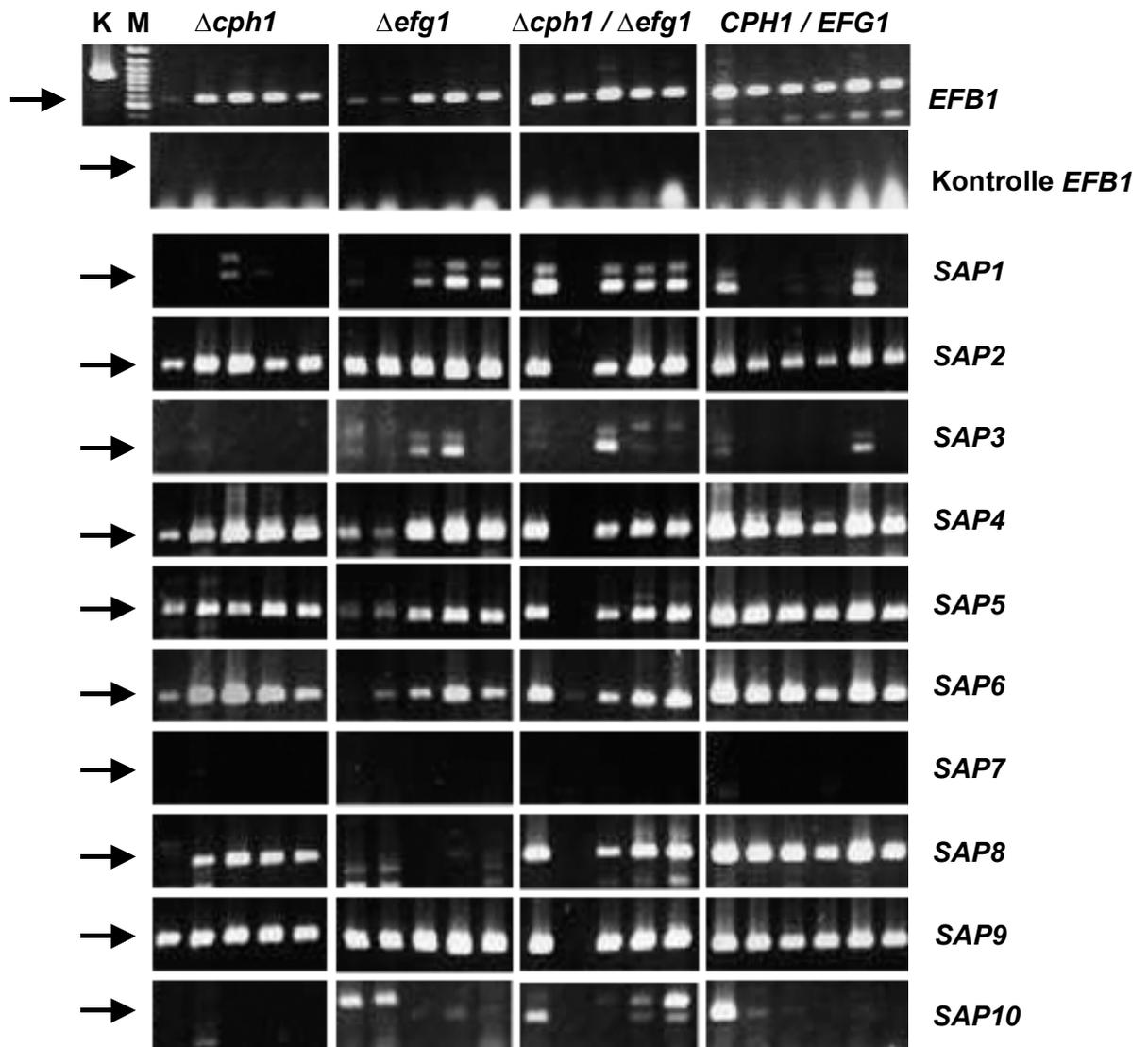


**Abb. 8.** Graphische Darstellung der Expression von SAP-Genen im Wildtypstamm SC5314 (A-E), in den  $\Delta cph1$ - (F) und  $\Delta efg1$ - (G) Einzelmutanten sowie der  $\Delta cph1 / \Delta efg1$ -Doppelmutante (H) im Modell systemischer Kandidose bei Balb/c-Mäusen.

Die Expressionsdynamik der SAP-Gene im SC5314 Wildtypstamm von *C. albicans* wurde nach 4 (A), 8 (B), 24 (C) und 72 Stunden (D) primärer Infektion in der Leber (jeweils 5 Organe) und 72 Stunden sekundärer Infektion in der Niere (jeweils 8 Organe) (E) untersucht. In den mutierten Stämmen wurde die Expressionsanalyse nach 24 Stunden Infektion in der Leber (jeweils 5 Organe) durchgeführt. Aufgeführt sind die positiven Nachweise der SAP-Transkripte unabhängig von der Expressionsstärke.

### III.1.3. DIE EXPRESSION DER *SAP*-GENE WIRD *IN VIVO* VON DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN *EFG1P* UND *CPH1P* BEEINFLUSST

Die Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p regulieren den Morphologiewechsel bei *C. albicans* (Lo *et al.*, 1997). Die entsprechenden Einzelmutanten und die Doppelmutante wurden in dem i. p. Infektionsmodell (II.4.4., III.1.2.2.) 24 Stunden nach Leberinfektion auf die Auswirkung der Deletion dieser Transkriptionsfaktoren auf die *SAP*-Expression analysiert (Abb. 8, Abb. 9). Die *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass der Funktionsausfall von Efg1p zur leichten Steigerung der Transkription von *SAP1* und *SAP2* und gleichzeitig zur Reduktion der Expression von *SAP4-6* und besonders stark von *SAP8* führte. Wie im Wildtypstamm waren *SAP3* und *SAP10* nur in vereinzelt Organen schwach exprimiert. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der  $\Delta cph1/\Delta efg1$ -Doppelmutante. In der  $\Delta cph1$ -Einzelmutante waren im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm weder *SAP3* noch *SAP10* in den untersuchten Organen exprimiert. In keinem Organ und zu keinem Zeitpunkt wurden *SAP7*-Transkripte nachgewiesen.



**Abb. 9. Expressionsanalyse von SAP-Genen in den  $\Delta cph1$ -,  $\Delta efg1$ -Einzelmutanten und der  $\Delta cph1 / \Delta efg1$ -Doppelmutante in infizierter Leber nach 24 Stunden.**

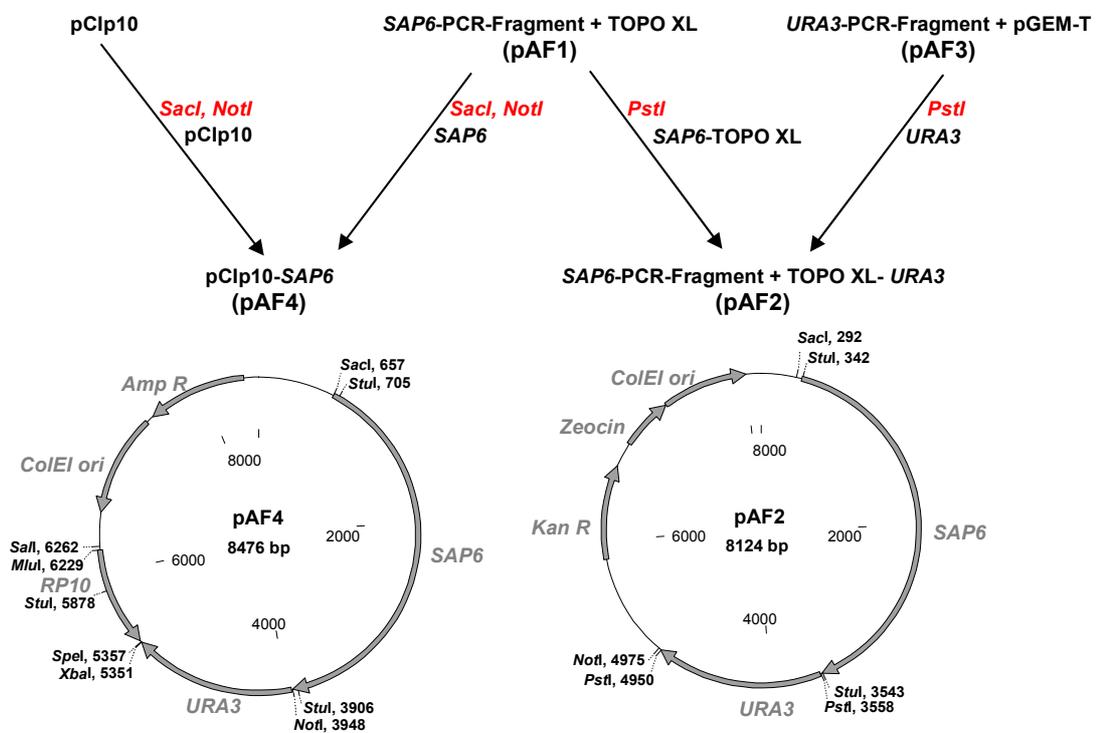
Die Expression einzelner SAP-Gene in den mutierten Stämmen  $\Delta cph1$ ,  $\Delta efg1$  und  $\Delta cph1 / \Delta efg1$  wurde mit dem Expressionsprofil des Wildtypstammes SC5314 ( $CPH1 / EFG1$ ) verglichen. Die Transkriptenanalyse wurde in einer PCR mit 2,5  $\mu$ l gereinigter cDNA und 35 Zyklen für *EFB1* und 5  $\mu$ l gereinigter cDNA und 40 Zyklen für SAP-Gene durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle auf die Verunreinigungen genomischer DNA wurde 1  $\mu$ l des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese vor der Zugabe von Reversen Transkriptase in der PCR mit *EFB1*-Primer getestet (Kontrolle *EFB1*). Bei der PCR mit genomischer DNA als Zusatz-Kontrolle (K) wurden 125 ng DNA eingesetzt.

### III.2. HERSTELLUNG EINER *SAP6*-RETRANSFORMANDE

In i. v. und i. p. Maus-Modell systemischer Mykosen war eine  $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante stark in ihrer Virulenz abgeschwächt (SANGLARD *et al.*, 1997, KRETSCHMAR *et al.*, 1999). Sie zeigte eine geringere Fähigkeit zu disseminieren und invadieren. Dabei war es nicht möglich zu präzisieren, welche der drei ausgeschalteten Proteasen für die Invasion von *C. albicans* ausschlaggebend waren. Um das Ausmaß der Gewebeerstörung bei der i. p. Infektion des Maus-Modells mit verschiedenen Mutanten ( $\Delta sap4$ ,  $\Delta sap5$ ,  $\Delta sap6$ ,  $\Delta sap4/5$ ,  $\Delta sap4/6$ ,  $\Delta sap5/6$ ) zu charakterisieren, wurde die Aktivität der gewebespezifischen Enzyme Alaninaminotransferase (ALT) der Leber und der Pankreas-charakteristischen Alpha-Amylase (AM) im Blut gemessen. Die Enzym-Werte deuteten auf eine stark reduzierte Invasivität und Gewebeschädigung bei der  $\Delta sap6$ -Einzelmutante und noch deutlicher bei den  $\Delta sap4/6$ - und  $\Delta sap5/6$ -Doppelmutanten (M. KRETSCHMAR, persönliche Mitteilung). Um die Auswirkung des fehlenden *SAP6*-Gens auf die Virulenz von *C. albicans* zu überprüfen, wurde ein funktionsfähiges *SAP6*-Allel in die  $\Delta sap6$ -Einzelmutante wiedereingeführt. Bei einer solchen Revertante sollte dann der Virulenzphänotyp des Wildtypstammes wiederhergestellt werden. Hierfür wurden zwei Plasmid-Konstrukte pAF2 und pAF4 (Abb. 10) hergestellt, mit denen die Ura3<sup>-</sup> auxotrophe homozygote  $\Delta sap6$ -Mutante transformiert wurde (II.5.2.18., II.5.2.19.), um ein *SAP6*-Wildtyp-Allel zu reintegrieren.

Dafür wurde ein 3213 bp langes, das *SAP6*-ORF enthaltendes DNA-Fragment mit den Primer S6Re 5' und 3' (Tab. 5, II.5.2.11.) amplifiziert, die jeweils eine *StuI*-Schnittstelle am 5'-Ende enthielten. Das Fragment schließt eine putative Promotor-Region von 1737 bp vor dem Start-Codon und eine 219 bp lange Sequenz mit Terminationssignalen und Poly(A)-Polymerase-Bindungsmotiven nach dem Stop-Codon ein. Das Amplifikat wurde mit eLONGase™ Enzyme-Mix und 150 ng genomischer DNA vom Stamm SC5314 synthetisiert (II.5.2.11.). Für die Herstellung des pAF2-Konstruktes (Abb. 10) wurde das *SAP6*-*StuI*-PCR-Fragment in den TOPO®XL PCR

Cloning Vector (II.1.) ligiert (pAF1-Vektor). In einer zweiten Klonierung wurde anschließend der *URA3*-Selektionsmarker mit seinen regulatorischen Elementen (Promotor, Terminator, Poly(A)-Polymerase-Bindungs-motiv) in die *Pst*I-Schnittstellen des pAF1-Vektors eingefügt (pAF2-Vektor). Das *URA3*-Fragment wurde aus 150 ng genomischer DNA mit *Taq* DNA-Polymerase synthetisiert (Tab. 5, II.5.2.11.). Das 1392 bp lange *URA3*-Amplifikat wurde in das pGEM<sup>®</sup>-T Vector (II.1.) kloniert (pAF3) und von dort mit den *Pst*I-Schnittstellen in den pAF1-Vektor übertragen (Abb. 10). Das Produkt wurde als pAF2 bezeichnet.

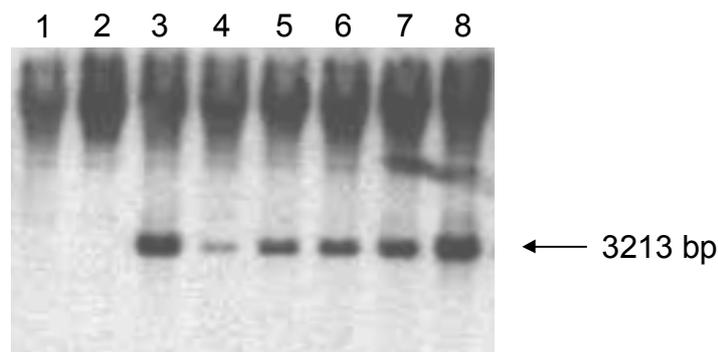


**Abb. 10. Klonierungsstrategie zur Herstellung von pAF2- und pAF4-Plasmide.** Durch die Klonierung des *URA3*-Markergens aus pAF3 in die *Pst*I-Restriktionsschnittstelle des Plasmids pAF1 mit dem *SAP6*-Gen und dem Rückgrad des TOPO<sup>®</sup>XL-Klonierungsvektors wurde pAF2 konstruiert. Das pAF4-Konstrukt wurde durch Klonierung des *SAP6*-Gens aus pAF1 in die *Not*I- und *Sac*I-Restriktionsschnittstellen des pCip10-Plasmids hergestellt.

Der Vektor pAF4 wurde aus dem pCip10-Vektor (II.1.) und dem *SAP6*-Fragment aus pAF1-Vektor zusammengestellt (Abb. 10). Beide Vektoren

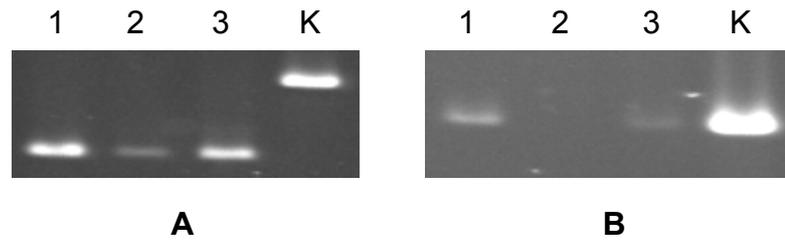
wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *NotI* linearisiert und das *SAP6*-Fragment in den pClp10-Vektor kloniert.

Die Ura3<sup>-</sup>-auxotrophe  $\Delta sap6$ -Mutante (II.1.) wurde mit den zirkulären Plasmiden pAF2 und pAF4 transformiert (II.5.2.19.). Die prototrophen Transformanten wurden auf das *Stul*-*SAP6*-Fragment in einer Southern-Blot-Analyse (II.5.2.12.) getestet (Abb. 11), indem die mit *Stul* geschnittene (II.5.2.7.) genomische DNA der Transformanten mit einer *SAP6*-DIG-markierten Sonde hybridisiert wurde. Die Sonde wurde mit Hilfe der RT-PCR Primer für *SAP6* hergestellt (Tab. 11, III.1.2., II.5.2.11.). Alle getesteten Revertanten zeigten das gleiche Bandenmuster und trugen im Gegensatz zum Wildtypstamm SC5314 und der  $\Delta sap6$ -Ausgangsmutante das 3213 bp *Stul*-Fragment, welches das intakte Allel für *SAP6* enthielt. Im nächsten Schritt wurden die Revertanten mittels RT-PCR-Analyse auf *SAP6*-Expression überprüft (Abb. 12) und damit die korrekte Transkription des Gens kontrolliert. Die Expression des Gens wurde bei der Myzelinduktion im Lee's-Medium induziert (II.2., II.4.3.). Die Genaktivität von *SAP6* wurde sowohl in einer Revertante mit dem pAF2-Konstrukt als auch in einer Revertante mit dem pAF4-Konstrukt nach zwei Stunden Inkubation detektiert.



**Abb. 11. Southern-Blot-Analyse von *SAP6*-Revertanten.**

Ca. 10 µg genomischer DNA wurde mit *Stul* restringiert. In die erste Spur des Auftrennungsgels wurde die DNA vom Wildtypstamm SC5314 (1), in die zweite die DNA von der Ura3<sup>-</sup>-auxotrophen  $\Delta sap6$ -Mutante (2) und in die folgenden fünf Spuren (3-8) die DNA von den isolierten Revertanten aufgetragen. In Spur 3 wurde die DNA einer Revertante, die das Konstrukt pAF2 erhielt, und in die weiteren Spuren wurde die DNA der mit pAF4 transformierten Revertanten getestet. Die Signale wurden mit einer *SAP6*-spezifischen Sonde detektiert. Die positiven Revertanten wiesen die 3213 bp lange *Stul*-Bande auf.



**Abb. 12. RT-PCR-Analyse von SAP6-Revertanten.**

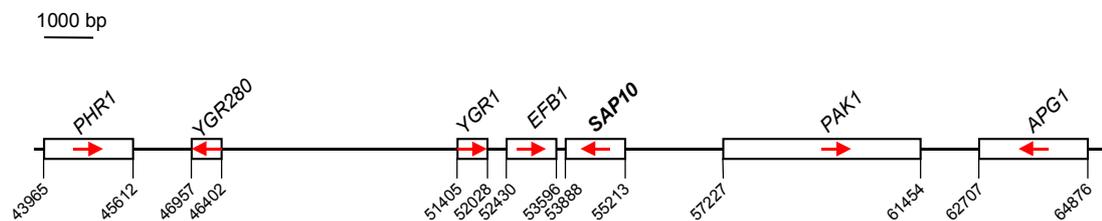
Die Expression von SAP6 (**B**) wurde im Lee's-Medium induziert. Dabei wurden die Transkripte in den Revertanten, die mit beiden pAF2- (Spur 1) und pAF4-Konstrukten (Spuren 2 und 3) komplementiert wurden, getestet. Die Reinheit der hergestellten cDNA wurde in einer Kontroll-PCR mit *EFB1*-Primer (**A**) überprüft. Als eine weitere Kontrolle wurde die genomische DNA (K) in der SAP6- und *EFB1*-spezifischen PCR verwendet.

### **III.3. DIE ASPARTAT PROTEASEN SAP9P UND SAP10P UNTERSCHIEDEN SICH STRUKTURELL VON DEN ANDEREN MITGLIEDER DER SAP-ISOENZYMFAMILIE**

#### **III.3.1. COMPUTERGESTÜTZTE UNTERSUCHUNGEN DEUTEN AUF DIE ZELLWANDLOKALISATION VON SAP9P UND SAP10P HIN**

Das vermutlich letzte Mitglied der SAP-Genfamilie *SAP10* (GenBank Nummer AF146440, FELK *et al.*, 2000) wurde durch eine kurze Sequenz im Rahmen des Genom-Projektes von *C. albicans* (<http://candida.stanford.edu>) durch Homologievergleiche entdeckt. Der 1323 bp lange *SAP10*-ORF wurde in pBluescript KS (+/-) kloniert (FELK *et al.*, 1998) und mit den Primer 10T7R1, 10T7R2, 10T7R3, 10T3-1, 10T3-2, 10T3-3 (II.5.2.11.) durchsequenziert (FELK *et al.*, 2000). Durch die Lokalisation von *SAP10* in Nachbarschaft zu bereits untersuchten Genen kann geschlossen werden, dass das Gen für Sap10p auf Chromosom 4 lokalisiert ist (Abb. 13). Es befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft des nur 34 bp vom Stop-Codon entfernten *EFB1*-Gens (MANEU *et al.*, 1996) und des 2014 bp vom Start-Codon entfernten *PAK1*-Gens. Die Eukaryonten-spezifischen regulatorischen Transkriptionsinitiationselemente (HAHN *et al.*, 1987) wurden mit dem TATAAA-Motiv -129 bp, und mit dem TATAA-Motiv -135 bp und -11 bp stromaufwärts vom Start-Kodon gefunden. Außerdem wurden Hefe-spezifische Transkriptionsinitiationselemente vom Typ RRYRR- (KOZAK, 1982) -81 bp mit dem AACAA-Motiv und -27 bp mit dem TTATT-Motiv gefunden. Das Terminationssignal TAGT sowie das Poly(A)-Polymerase-Bindungsmotiv AATAAA sind +257 bp und +281 bp stromabwärts vom Stop-Codon TGA lokalisiert. Das abgeleitete 441 Aminosäuren lange Sap10p-Protein weist neun putative N-Glycosylierungsstellen auf. Wie die anderen Proteine der Sap-Isoenzymfamilie wird Sap10p wahrscheinlich als Präproenzym translatiert. Nach den Kriterien von VON HEIJNE (1986) kann das putative 16 oder 20 Aminosäuren lange N-terminale Signalpeptid (Nummerierung vom Start) beim passiven Transport in das ER entweder

zwischen Serin (S<sup>16</sup>) und Valin (V<sup>17</sup>) oder Cystein (C<sup>20</sup>) und Serin (S<sup>21</sup>) abgespalten werden. Das Sap10p-Zymogen kann potentiell von der im Golgi-Apparat lokalisierten Kex2p-Serin-Protease an einer einzigen hochkonservierten Lysin-Arginin (KR) Erkennungssequenz in der Position 37 prozessiert werden. Wie auch bei anderen Saps wird die dreidimensionale Proteinstruktur wahrscheinlich mit zwei Disulfid-Brücken zwischen vier konservierten Cystein-Resten aufrechterhalten. Die theoretische molekulare Masse von Sap10p beträgt ca. 43 kD.



**Abb. 13. Lokalisation des SAP10-Gens auf dem Chromosom 4.**

Bei der Untersuchung der SAP10-Sequenz wurde das EFB1-Gen in der unmittelbaren Nähe, nur 34 bp vom Stop-Kodon des SAP10-Gens, festgestellt. Auf der anderen 5' Seite des ORFs, 2014 bp vom Start-Kodon des SAP10-Gens befindet sich das PAK1-Gen. PAK1 kodiert für eine A364A Protein-Kinase. Darauf folgt das APG1-Gen, das für eine weitere Serin- / Threonin- Protein-Kinase kodiert. Die beiden YGR1 und YGR280 Gene auf der 3' Seite von SAP10 kodieren für putative RNA-Bindungsproteine mit hochkonservierten G-patch Domänen. Am gleichen Locus wurde das Gen für das pH-regulierte Zellwand-Protein Phr1p identifiziert. Die Sequenzen der abgebildeten Gene wurden aus den Contigs 6-2495 und 5-3196 des Genomprojektes übernommen (<http://www-sequence.stanford.edu:8080/contigs-to-blast6.html>).

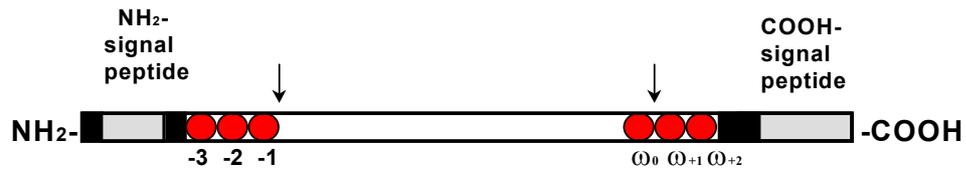
Sap10p zeigte nur moderate Ähnlichkeiten (Abb. 14) zu den meisten anderen Proteasen der SAP-Genfamilie, wies jedoch eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Sap9p auf. Die beiden Proteasen unterscheiden sich von den anderen Sap-Isoenzymen durch ihren längeren C-Terminus mit einer **G**lycosyl-**P**hosphatidyl-**I**nositol- (GPI) Erkennungssequenz (CARO *et al.*, 1997). Diese GPI-Proteine werden in der Zellwand oder Plasmamembran verankert. Für das Anknüpfen des GPI-Restes sind drei sogenannte  $\omega$ -Positionen  $\omega_0$ ,  $\omega_{+1}$  und  $\omega_{+2}$  von Bedeutung, die von bestimmten Aminosäuren besetzt werden (UDENFRIED & KODUKULA, 1995). Diese

Positionen sind in Sap10p von Asparagin (N<sup>398</sup>), Threonin (T<sup>399</sup>) und Serin (S<sup>400</sup>) vertreten. Nach diesem Erkennungssignal folgt eine für GPI-Proteine typische Serin / Threonin-reiche, hydrophile Verbindungsdomäne und anschließend eine hydrophobe Domäne (Abb. 15).

	Sap1p	Sap2p	Sap3p	Sap4p	Sap5p	Sap6p	Sap7p	Sap8	Sap9p	Sap10p
<b>Sap1p</b>	391	71%	68%	53%	52%	53%	19%	46%	21%	27%
	0	79%	80%	69%	69%	69%	30%	57%	32%	40%
	0	3%	3%	10%	9%	10%	35%	16%	37%	28%
<b>Sap2p</b>	286	398	70%	52%	50%	52%	20%	49%	22%	26%
	319	0	80%	67%	65%	65%	32%	60%	33%	39%
	15	0	2%	10%	9%	9%	34%	14%	37%	28%
<b>Sap3p</b>	276	286	398	52%	48%	51%	19%	50%	22%	25%
	321	325	0	69%	66%	67%	31%	61%	34%	39%
	13	10	0	8%	7%	8%	34%	13%	37%	29%
<b>Sap4p</b>	230	224	222	417	76%	89%	20%	43%	23%	24%
	298	288	294	0	88%	95%	32%	56%	34%	36%
	44	43	37	0	1%	0%	31%	11%	38%	32%
<b>Sap5p</b>	223	215	207	323	418	79%	21%	42%	22%	24%
	296	279	283	371	0	89%	32%	55%	35%	37%
	39	40	32	7	0	1%	30%	12%	38%	32%
<b>Sap6p</b>	230	225	219	376	336	418	21%	43%	23%	23%
	296	283	289	399	376	0	33%	56%	34%	35%
	43	42	36	3	6	0	30%	11%	38%	32%
<b>Sap7p</b>	114	121	117	122	126	128	588	20%	15%	14%
	181	192	185	195	194	199	0	32%	26%	25%
	211	204	202	185	182	184	0	33%	49%	46%
<b>Sap8p</b>	200	213	218	192	188	190	122	405	22%	23%
	247	261	267	249	244	248	197	0	34%	36%
	70	61	59	52	53	51	201	0	38%	35%
<b>Sap9p</b>	125	132	129	143	136	142	118	133	544	25%
	188	195	198	205	208	203	199	203	0	38%
	213	216	216	231	226	230	370	229	0	29%
<b>Sap10p</b>	134	127	126	126	124	123	100	123	149	441
	194	194	196	187	192	184	168	186	222	0
	136	137	143	168	167	167	313	180	169	0

**Abb. 14. Homologie-Untersuchung von Sap10p zu den anderen Mitglieder der SAP-Genfamilie.**

Dieser statistische Report wurde mit Hilfe des GeneDoc Programms (NICHOLAS & NICHOLAS JR., 1997) erstellt und beschreibt den Vergleich zwischen den einzelnen Sequenzpaaren. Dabei wurden drei Zahlen generiert. Die obere gibt die Anzahl von Aminosäurenresten an, die identisch in den beiden Proteinen sind. Die mittlere Zahl entspricht ähnlichen oder konservativ substituierten Aminosäurenresten. Die untere Zahl charakterisiert die entstandenen Lücken beim Vergleich von Aminosäurefolgen zweier Proteinen. Auf der rechten Seite der Matrix sind die prozentualen Angaben und auf der linken Seite die Anzahl von Aminosäurenresten aufgezeichnet. Diagonale Zahlen (rot gedruckt) bezeichnen die Sequenzlänge der Sap-Proteasen.

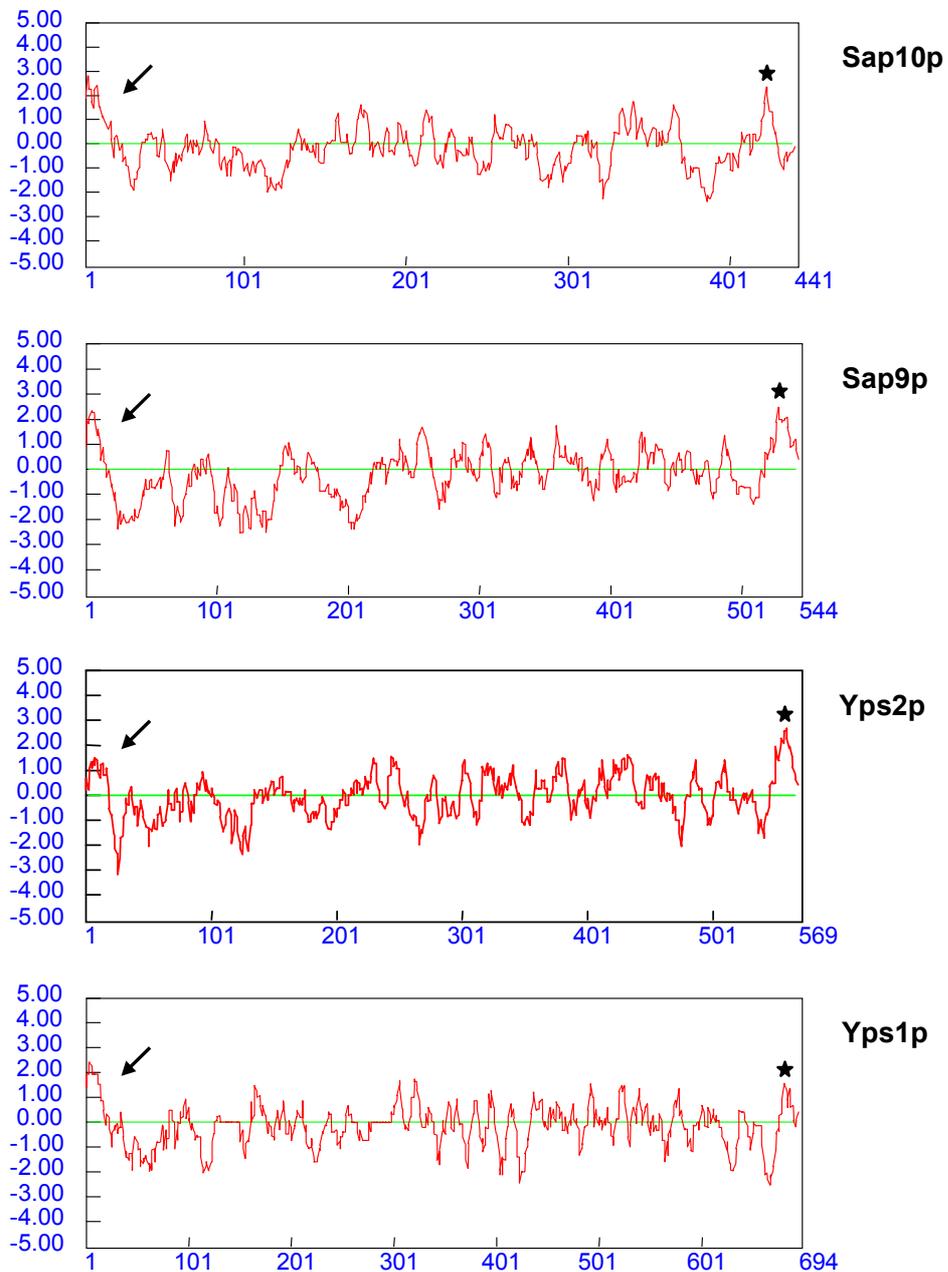


**Abb. 15. Schematische Struktur eines charakteristischen GPI-Proteins.**

GPI-Proteine werden über den sogenannten „Secretory Pathway“ geleitet. Sie werden am Ende der N-terminalen Signalsequenz nach der Position  $-1$  beim Einschleusen in das ER und später in dem ER an der GPI-Konsensussequenz zwischen den Positionen  $\omega_0$  und  $\omega_{+1}$  am C-Terminus gespalten. Beide Schnittstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das GPI-Erkennungssignal besteht aus einer Erkennungs- bzw. einer Spaltungsdomäne (rote Kreise), einer Serin- / Threoninreichen hydrophilen Domäne mit meistens 8-12 Aminosäuren (schwarzes Feld) und einer hydrophoben Domäne mit 15-30 Aminosäuren (hell graues Feld). Die Erkennungssequenz für die GPI-Verankerung ist an den  $\omega_0$  und  $\omega_{+2}$  Stellen besonders stark konserviert. Diese Positionen  $\omega_0$  und  $\omega_{+2}$  werden mit den experimentell bestimmten Aminosäuren G, A, S, C, D, N und G, A, S besetzt (UNDENFRIED AND KODUKULA, 1995). Die Spaltung an der Signalsequenz am N-Terminus ist ähnlich geregelt. In der Erkennungssequenz sind in der Position  $-3$  und  $-1$  meistens G, A, S und G, A, S, C, T (VON HEIJNE, 1986).

Mit dem Suchprogramm Blastp Search wurde in der NCBI-Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach Sap10p-homologen Proteinen gesucht. Dabei wurden Yapsin1 (Yap3p), Yapsin2 (Mkc7p) und Bar1p von *S. cerevisiae* gefunden. Alle drei Proteine sind Aspartat-Proteasen. Yapsin1 (Yps1p) und Yapsin2 (Yps2p) (Abb. 17) sind Zellmembran verankerte GPI-Proteine (KOMANO & FULLER, 1995) und Bar1p ist ein sekretiertes, extrazelluläres Protein (MACKAY *et al.*, 1988). Im C-terminalen Bereich besitzen Yps1p und Yps2p eine putative KR- / KK-Erkennungssequenz, die möglicherweise für Zellmembran-verankerte Proteine spezifisch ist (CARO *et al.*, 1997). Dagegen weisen Sap9p und Sap10p solche C-terminalen dibasischen Sequenzen nicht auf und werden daher wahrscheinlich in der Zellwand lokalisiert (CARO *et al.*, 1997). Die Proteinsequenzen von Sap9p, Sap10p, Yps1p und Yps2p zeigten im Kyte-Doolittle Hydrophobizitäts-Plot (Abb. 16) eine Anhäufung von hydrophoben Aminosäuren, die in dem N-Terminus der Signalsequenz des Prepropeptides und dem C-Terminus der GPI-Signalsequenz entsprachen. Beim Sequenzvergleich zwischen den Mitgliedern der Sap-Enzymfamilie und Yps1p sowie Yps2p auf Proteinebene

wiesen Sap9p und Sap10p die größten Sequenzhomologien zu den beiden

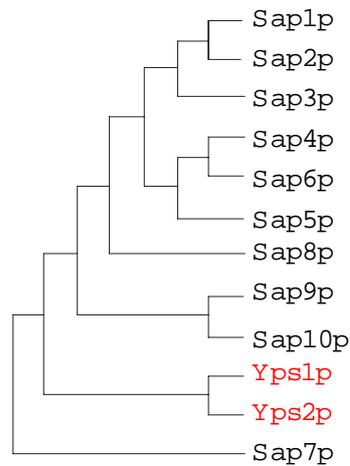


**Abb. 16. Kyte-Doolittle Hydrophobizitätsplot von Sap9p, Sap10p, Yps1p und Yps2p.**

Mit Hilfe des Hydrophobizitätsplots lassen sich die membranverankerte Regionen eines Proteins vorhersagen. Regionen mit einem Wert höher als +0,5 werden als Membran-eingebettet akzeptiert. Mit dem Stern sind die hydrophoben Regionen der GPI-Signalsequenz am C-Terminus und mit dem Pfeil die Signalsequenz am N-Terminus gekennzeichnet.

<pre>                 20          40       M L 6      L      K      K F SAP9P : MRLNSVALL---SLVATALAAKAP-----FKIDF : 26 SAP10P : MDLVMNFV---FLLYLTSVVKCS-----IKLDF : 26 YPS1P : MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGKIIIPAANKRDDSDNSKFKVLPF : 43 YPS2P : MKLSVLTFVVDALLVCSISVDAGVTFPSPLESEVYVKMN--F : 41             </pre>	<pre>                 220          240       YG35N3 S TF NNT FSI Y * 3 A G 5G D 6 SAP9P : SYGSFNTENSDFTKKNNNTDFEIQYADDTSAIGIWDVDTIIS : 239 SAP10P : FNGTYNSKSKTF--KNTSEDFSIQYVDSAAQGVWQVDSVQFG : 155 YPS1P : QYGTFTSGSSYFRSNNTY--FSISYGDGTFASGTFGTVDLWLS : 229 YPS2P : TYGTFTNTSKSSTFNSNTE--FSIAYGDTTFASGTFWGHDLQSLN : 216             </pre>	<pre>                 440          460       G Y 6 C D SAP9P : GAYVVCNCLADSSRTVDIEFGNKTIKVPIISDLVLQASKST-- : 440 SAP10P : SVVEIECDGYDEHFFGFSIGSDSDFVPIQDLKTEKDGQ---- : 332 YPS1P : GYVLDPCSDSMEIVDFGGFHINAPLSSFILSTGTT----- : 437 YPS2P : GYIMDCIKEMEESIIIFDFGGFYLSNWLSDFLQVLTDSRSNI : 431             </pre>
<pre>                 60          80       K ↓ G S      R KR ↓      Q SAP9P : EVRRGESKDDLSPEDDSNPRFVKRDGSLDMTLTKNQTFYMATL : 69 SAP10P : NKVLTPSKYT-----KRDALPMLINDKILYTTTELE : 57 YPS1P : HKLYGDSLENVGSDDKKPEVRLLRKRDAGYEEIITNQQSFYSVD : 86 YPS2P : QKKYGSFENALDDTKGRTRLMTRDDYELVELTNQNSFYSVE : 84             </pre>	<pre>                 260          280          300       6TGLSFA6ANE3 S G6LGIG6P LE T SAP9P : NVTVKDLSFAIANETSSDVGVLGIGLPLEVITQLRYTYQNLP : 282 SAP10P : QYGVTLGKIGIANRSSVSDGILGIGIANGVDFPVLQKQGLI : 198 YPS1P : DLNVTGLSFAVANETSNMGVLGIGLPLEVITVSGTASHSGK : 272 YPS2P : DLNITGLSFAVANETSNVTGVLGIGLPLESTYSGVLSVSVQR : 259             </pre>	<pre>                 480          500       C LG6 S SAP9P : CILGVMQSSSSSYMLFGDNILRSAYIVYDLDDEYVSLAQVSY : 483 SAP10P : CYLAIMNSNVIGGGILFGDDILRQIYLVYDLQDMTISVAPVV : 375 YPS1P : CLLGIPTSDTGTILGDSFLTNAVYVDLENLEISMAQARYN : 480 YPS2P : CILGIAPQSDPTIILGDNFLANTYVYDLDNMEISMAQANFSD : 474             </pre>
<pre>                 100          120       V 6 *TGSSDLW6M D C SAP9P : KIGSNEDENRVLE-DTGSSDLWMSHDL-KCVSAPISKRNERS : 110 SAP10P : IGSNKDKVSVSI--DTGSYDLWMSNDA-VCYKVSEFQTEGAP : 97 YPS1P : LEVGTTPQNVTLVDTGSSDLWMSGSDNFCSSNSM-GSSRRR : 128 YPS2P : LDIGTPPQKVTVLVDTGSSDLWVTGSDNFCYCKRKR-DTTGSS : 126             </pre>	<pre>                 320          340       6 NS      T SAP9P : LKLDKADGIIAKSLYSLYLNADAKAGSILFGAIDHAKYQGDV : 325 SAP10P : NKIAYSVYLNSSNTTGTILFGAIDHAKYKALSTVPVDSKSQ : 241 YPS1P : AYKYDNFPVILKNSGAIKSNYSYLYLNDSDAMHGTILFGAVD : 315 YPS2P : SYTYNNFPMVLKNSGVIKSTAYSLFANDSDSKHGTILFGAVD : 302             </pre>	<pre>                 520          540       S S S SAP9P : TNKESIEVIGASCIINSICGCTSSSCFSTSTTRHAGIIL : 526 SAP10P : YTEDEIEEILNPNEDQNEVPTNTSFTQKASSGCQFVQPIVV : 418 YPS1P : TTSENIEIITSSVPSAVKAPGYINWPSAIVTGNIFTVNS : 523 YPS2P : DGEYIEIESAVFSALKAPGYSSWFTYELIVCGNMESSAAN : 517             </pre>
<pre>                 140          160 SAP9P : FGHGTGVLNERELMQRKNLYQPSRTIETDEEKEASEKIHNK : 153 SAP10P : QLPDFNDIDQDYS----- : 111 YPS1P : VIDKRDSSSGSLINDINFPGLWTGTSAIGPTATGLGGGSG : 171 YPS2P : FKQVNDALASVVEVFTEISYDTIVTSEATATFDSTASTSQ : 169             </pre>	<pre>                 360          380       Y N      G SAP9P : TVKMMRTYSQISYPVRIQVPLKIDVSSSGSTTNILSGTTG- : 367 SAP10P : LSVNVTNLKTKNGNVAS-----GGHS- : 262 YPS1P : SKYTGLTYTPIVNTLSAIGFSFPQFDVTLINGIGISDSGSSN : 358 YPS2P : GKYAGDLTYTPIINTLQHRGKDPQFQVTLQGLGTSGKGDKE : 345             </pre>	<pre>                 560          580          600 SAP9P : NPYVGLLSLLISYVYLVY----- : 545 SAP10P : RTWTRTLAVPVAIAKHVHGSPY----- : 441 YPS1P : SQKAFQGNLTSTSAATSTSKRNVDGHIHVPSPILTLISLLF : 566 YPS2P : SSISYFASVTSKAPSSSSSKGQRKCTCTAALSTSKTSTSTST : 560             </pre>
<pre>                 180          200       C SAP9P : LFGFGSIYSVTVYITTEGPAAYSTFPLVGTGEGSGSGSNTCR : 196 SAP10P : -----CT : 113 YPS1P : TATQSVFASAEATMD-----CQ : 187 YPS2P : LID-----CA : 174             </pre>	<pre>                 400          420       6LD3G3T 3Y P 6 6 6 A YS SAP9P : -----VVLDTGSTLSYVFSDTLQSLGKALNGQYNSV : 399 SAP10P : -----ILLDTGSTFIFPDEWIDALGHSLNATYDEDE : 294 YPS1P : KTLTTLTKIP--ALLDSGTTLTFLPQTVVSMIATELGAQYSSRI : 399 YPS2P : NLTTLTTLTKIPVLLDSGTTIISYMPTELVKMLADQVGYSSAY : 388             </pre>	<pre>                 620       * SAP9P : ----- : - SAP10P : ----- : - YPS1P : AFI----- : 569 YPS2P : GMLPSTSSSPKRENGGHNLNPPFFARFTTAIPH----- : 595             </pre>

**Abb. 17. Sequenzvergleich von Sap9p, Sap10p von *C. albicans* und Yapsin1, Yapsin2 von *S. cerevisiae*.**  
 Der Sequenzvergleich wurde mittels des Programms GeneDoc (NICHOLAS & NICHOLAS JR., 1997) durchgeführt. C-terminal besitzen Sap9p, Sap10p, Yapsin1 und Yapsin2 ein GPI-Konsensusmotiv. Die  $\omega_0$ ,  $\omega_{+1}$  und  $\omega_{+2}$  Positionen sind mit blauer Farbe unterlegt. Dem GPI-Konsensusmotiv folgt eine Serin- / Threonin-reiche Region (grün unterlegt), die über diese Aminosäuren mit kurzen Mannose-Ketten O-glykosyliert ist. Zum Schluss kommt einer Region mit vielen hydrophoben Aminosäuren. Diese Daten legen nahe, dass Sap9p und Sap10p GPI-Proteasen sind, die an der Zellwand oder an der Plasmamembran verankert sind. Die KR- und RR-Prozessierungssequenzen am N-Terminus sind mit gelber Farbe unterlegt und die C-terminale KR- / RK-Sequenzen ist mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Die großen Buchstaben über den Sequenzen deuten auf die stark konservierten Regionen in der Sequenz mit 100% identischen Aminosäuren und die Zahlen deuten die hydrophilen (3), aromatischen (5) oder hydrophoben (6) Aminosäuren an. Die Aspartat-Reste in dem katalytischen Zentrum sind mit einem Sternchen versehen.



**Abb. 18. Dendrogramm der Sap-Isoenzyme von *C. albicans* sowie Yapsin1 (Yps1p) und Yapsin2 (Yps2p) von *S. cerevisiae*.**

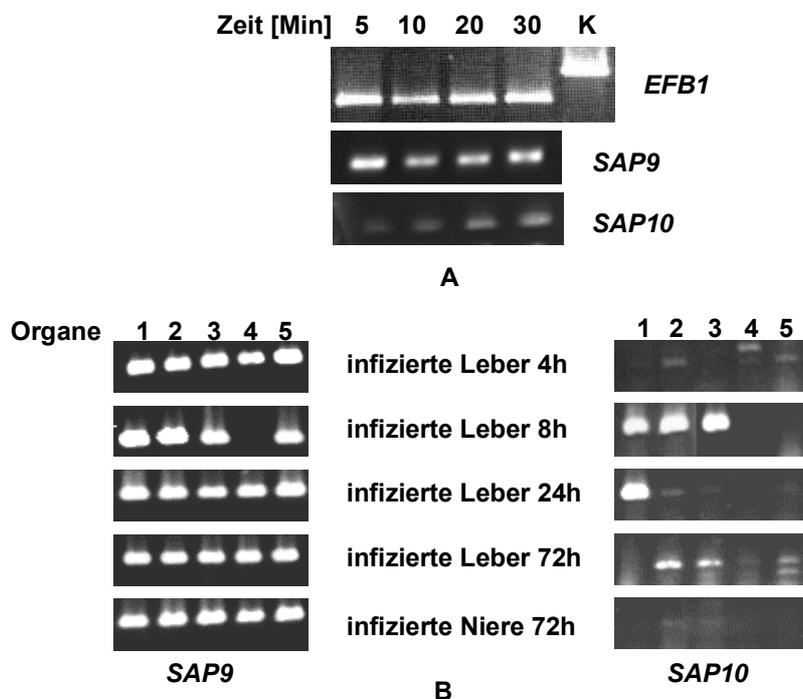
Die Proteinsequenz von Sap10p zeigt die höchsten Homologien zu Sap9p. Im Vergleich zu den anderen Sap-Isoenzymen besitzen beide einen ca. 50 Aminosäuren längeren C-Terminus mit einer GPI-Ankersequenz und zeigen hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu Yps1p und Yps2p von *S. cerevisiae*.

Aspartat-Proteasen von *S. cerevisiae* (Abb. 17, Abb. 18) auf. Auch strukturell sind alle vier Proteine sehr ähnlich. Außer dem GPI-Verankerungssignal und dem Signalpeptid besitzen sie ein katalytisches Zentrum mit zwei Aspartat-Resten, vier Cysteine und KR- / RR- Motive für eine Kex2p-Prozessierung. Die Ähnlichkeiten in der Struktur und möglicherweise in der Lokalisation von Sap9p, Sap10p, Yps1p und Yps2p lassen vermuten, dass sie eine ähnliche Funktion haben könnten. Yps1p und Yps2p sind in der Lage, ähnlich wie Kex2p, die dibasische KR-, RK-, KK-, RR-, aber auch monobasische K- / R-Sequenzen eines Zymogenes zu erkennen und an dieser Stelle die Proteine zu prozessieren (EGEL-MITANI *et al.*, 1990, AZARYAN *et al.*, 1993, OLSEN *et al.*, 1998, ROCKWELL & FULLER, 1998, KOMANO *et al.*, 1999). Möglicherweise sind Sap9p und Sap10p von *C. albicans* homologe Proteine zu Yps1p und Yps2p von *S. cerevisiae* und können, redundant zu Kex2p, eine prozessierende Funktion ausführen.

### III.3.2. DIE EXPRESSION VON *SAP9*- UND *SAP10*-GENEN WIRD UNTERSCHIEDLICH REGULIERT

*In vivo* und *in vitro* Expressionsanalysen zeigten Unterschiede in der Regulation von *SAP9*- und *SAP10*-Genen. Unter allen getesteten Bedingungen *in vitro*, z. B. beim Morphologiewechsel (Abb. 3, III.1.1.1.1.), während des Wachstums in Minimalmedium mit Protein (Abb. 4A, III.1.1.1.2.)

bzw. Ammoniumsulfat (Abb. 4B) als einzigen Stickstoffquellen erwies sich das *SAP9*-Gen als gleichmäßig und stark exprimiert, während das *SAP10*-Gen unterschiedlich reguliert wurde. Eine starke Induktion des *SAP10*-Gens wurde unter den getesteten *in vitro* Bedingungen bei der Myzelbildung und in der Gegenwart von BSA im Medium nachgewiesen. In den beiden myzelinduzierenden Medien stieg die Aktivität des Gens kontinuierlich an (Abb. 3). Die Anwesenheit von BSA im Minimalmedium führte zur gleichmäßig starken Expression des Gens (III.1.1.1.2.). Dagegen wurde in Minimalmedium mit Ammoniumsulfat die Transkription von *SAP10* drastisch reduziert (Abb. 4, III.1.1.1.3.).



**Abb. 19. Expressionsanalyse von *SAP9* und *SAP10* im menschlichen Blut (A) und während i. p. *Candida*-Infektionen (B).**

Die Untersuchung der Expression von *SAP9*- und *SAP10*-Genen bei Inkubation in menschlichem Blut wurde mit Hilfe von RT-PCR mit 25 Zyklen durchgeführt. Die Transkripte wurde nach 5, 10, 20 und 30 min Inkubation untersucht (A).

Untersuchung des Expressionsmusters zu unterschiedlichen Infektionsstadien (4, 8, 24 und 72 h) in unterschiedlichen Organen (Leber, Niere) nach i. p. Infektion in Mäusen (B, siehe auch Abb. 8).

Um zu untersuchen, ob *SAP9* und *SAP10* bei dem Eintritt von *C. albicans* in das Blutgefäßsystem exprimiert werden, wurde die Expression dieser Gene auch im menschlichen Blut (*ex vivo*) getestet (II.4.4.). Mit Hilfe der RT-PCR-

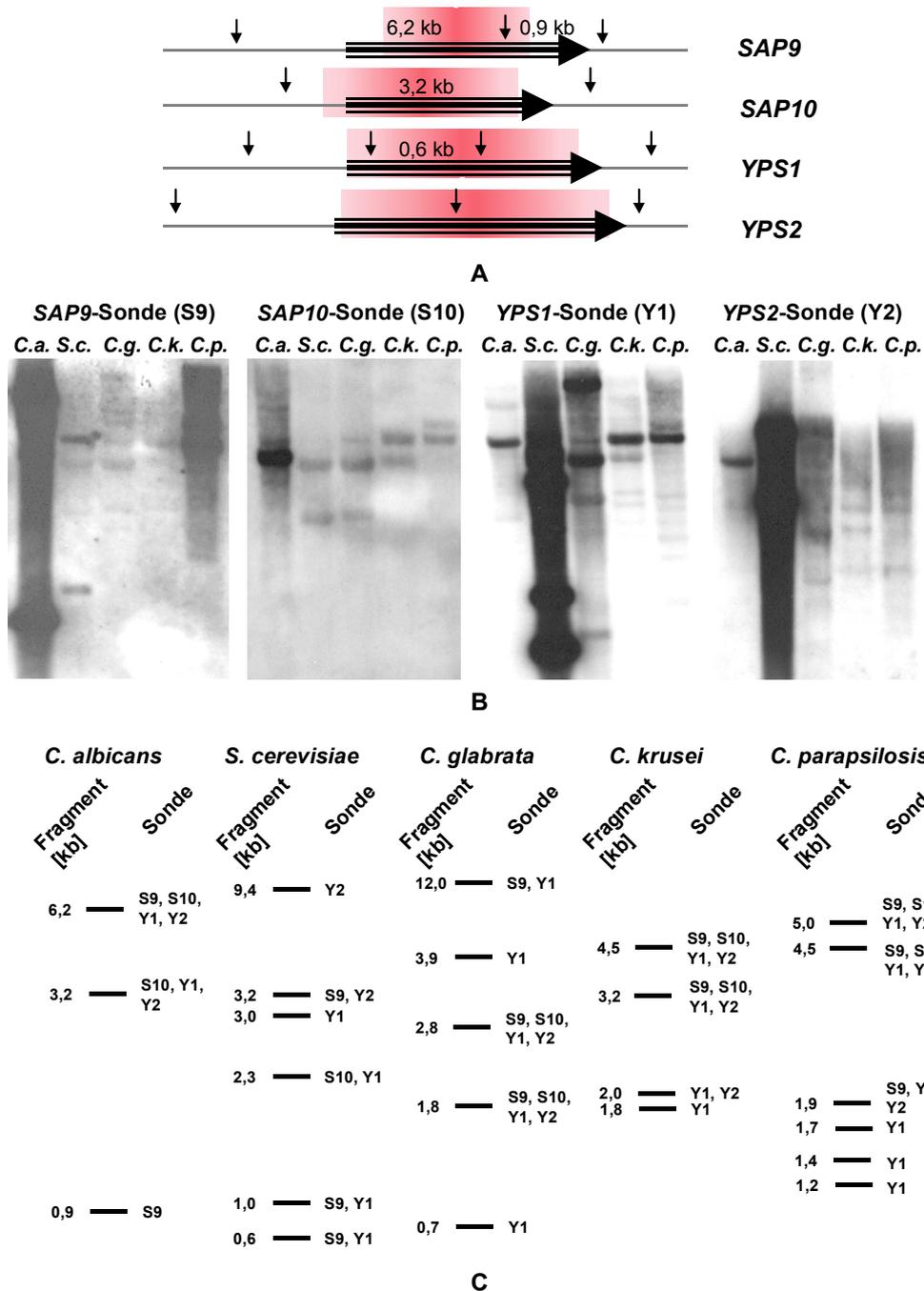
Technik wurde das Expressionsmuster nach 5, 10, 20 und 30 min Inkubation getestet (Abb. 19A). Die Transkription von *SAP9* war zu allen getesteten Zeitpunkten nahezu unverändert stark. Im Gegenteil dazu wurde die *SAP10*-Transkription im Laufe der Inkubation kontinuierlich gesteigert. Ein ähnliches Expressionsprofil von *SAP9*- und *SAP10*-Genen konnten in Makroarray-Expressionsanalysen von C. FRADIN (persönliche Mitteilung) im Rahmen des gleichen Versuches bestätigt werden.

Die Analyse des Expressionsmusters beider Proteasegene wurde auf *in vivo* Experimente erweitert (Abb. 7, Abb. 8, III.1.2.). In einem Maus-Modell wurde die Expression bei oraler Infektion (III.1.2.1.) und im zeitlichen Verlauf der i. p. Infektion (III.1.2.2.) untersucht. Wie auch bei den *in vitro* Studien konnte die Expression von *SAP9* als gleichmäßig und stark bezeichnet werden. Die Transkripte wurden bei oralen und i. p. Infektionen in nahezu allen untersuchten Organen und zu allen Infektionsstadien nachgewiesen. Die Expression von *SAP10* wurde offensichtlich im Laufe der Infektion reguliert. Die meisten Transkripte wurden zu den mittleren Zeitpunkten der i. p. Infektion nachgewiesen. In den ersten Stadien der i. p. Infektion (4 h) wurde nur eine schwache Expression von *SAP10* nachgewiesen, die mit der Etablierung der Keime in den Organen (8 h, 24 h) in ihrer Intensität stark zunahm. Im weiteren Verlauf der Infektion (72 h) wurde die Transkription des Gens wieder schwächer und in der Niere, dem Organ mit sekundärer *Candida*-Infektion, war sie nicht nachweisbar (Abb. 8, Abb. 19). Bei den oralen Infektionen konnten die *SAP10*-Transkripte nur in einigen infizierten Oesophagen nachgewiesen werden (Abb. 7).

### **III.3.3. *SAP9*- UND *SAP10*-ÄHNLICHE GENE WURDEN IN DEN GENOMEN ANDERER, AUCH IN NICHT PROTEOLYTISCHER, *CANDIDA*-ARTEN GEFUNDEN**

Wegen des Vorhandenseins der Zellmembran-verankerten Homologen Yps1p und Yps2p in der nicht proteolytischen, *Candida*-verwandten Bäcker-Hefe *S. cerevisiae* stellte die sich die Frage, ob GPI-Aspartat-Proteasen auch

in anderen *Candida*-Arten identifiziert werden können. Deshalb wurden die Genome von *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* mittels Southern-Blot-Analyse auf Genanaloge von *SAP9*, *SAP10*, *YPS1* oder *YPS2* getestet. Zwei von den untersuchten *Candida*-Arten *C. glabrata* und *C. krusei* gelten als nicht proteolytisch. Eine Detektion der *SAP9*-, *SAP10*-, *YPS1*- und *YPS2*-Genanalogen bei diesen *Candida*-Arten würde eine ausschließliche Beteiligung von Sap9p- und Sap10p-Proteasen an der extrazellulären proteolytischen Aktivität in Frage stellen und eine Aussage über eine anderweitige Funktion dieser Proteasen unterstützen. Die isolierte genomische DNA (II.5.2.3.) von allen genannten Arten wurde im Southern-Blot (II.5.2.12.) mit *SAP9*-, *SAP10*-, *YPS1*- und *YPS2*-spezifischen Sonden untersucht (Abb. 20), die mit folgenden Primerpaaren in einer PCR mit DIG-markierten dUTPs (II.5.2.12.) erzeugt wurden: *SAP9* 5'2 / 3'2, *SAP10* 10T7R1 / 10HindIII, *YPS1* 5' / 3', und *YPS2* 5' / 3' (Tab. 5, II.5.2.11.) und decken jeweils den größten Teil der ORFs dieser Gene ab (Abb. 20). Die genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und mit den *SAP9*-, *SAP10*-, *YPS1*- sowie *YPS2*-Sonden unter niedrig stringenten Bedingungen hybridisiert (II.5.2.12.). Im Genom der nicht proteolytischen *Candida*-Arten existieren tatsächlich Sequenzen, die sowohl zu *SAP9* und *SAP10* von *C. albicans* als auch zu *YPS1* und *YPS2* von *S. cerevisiae* Ähnlichkeiten haben. Bei *C. krusei* zeigten die Untersuchungen zwei Banden einer Größe von 4,5 und 3,2 kb, die von allen Sonden erkannt wurden. Lediglich beim Hybridisieren mit der *YPS2*-Sonde waren die Signale nur schwach erkennbar. Von der *YPS1*-Sonde wurden 2,0 und 1,8 kb große Banden und von der *YPS2*-Sonde eine 1,8 kb große Bande markiert. Das *C. glabrata* Genom enthält möglicherweise weitere analoge Sequenzen. Außer 2,8 und 1,8 kb großen Fragmenten, die von allen vier Sonden erkannt wurden, waren mit der *YPS1*-Sonde auch noch drei zusätzliche 12,0, 3,9 und 0,7 kb Fragmente nachweisbar. Von diesen Fragmenten hybridisierte das hochmolekulare 12,0 kb Fragment auch mit der *SAP9*-Sonde. In der proteolytischen Art *C. parapsilosis* wurden zwei 5,0 und 4,5 kb große Fragmente mit allen Sonden detektiert. Die beiden Fragmente hybridisierten am stärksten mit den



**Abb. 20. Nachweis SAP9-, SAP10-, YPS1-, und YPS2-ähnlicher Gene in nicht proteolytischen *Candida* sp..**

(A) Lokalisation der hergestellten SAP9-, SAP10-, YPS1-, und YPS2-spezifischen Sonden (rotes Feld) im ORF dieser Gene (gestreifte Pfeile) mit angezeigten *EcoRI*-Schnittstellen (kleine Pfeile).

(B) Die genomische DNA von *C. albicans* (C.a.), *S. cerevisiae* (S.c.), *C. glabrata* (C.g.), *C. krusei* (C.k.) und *C. parapsilosis* (C.p.) wurden im Southern-Blot analysiert. Sie wurden mit *EcoRI* geschnitten, auf Nylon-Membran übertragen und mit SAP9- (S9), SAP10- (S10), YPS1- (Y1) und YPS2- (Y2) Sonden niedrig stringent hybridisiert.

(C) Schematische Darstellung der mit SAP9-, SAP10-, YPS1-, und YPS2-Sonden identifizierten Fragmente in *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis*. Erklärung siehe im Text.

*SAP9*- und *YPS1*-Sonden. Die für *S. cerevisiae* spezifischen Sonden erkannten nur das 3,2 kb große *SAP10*-Fragment und das 6,2 kb große *SAP9*-Fragment von *C. albicans*. Entsprechend wurden nur drei von vier *YPS1*-Fragmenten mit der *SAP9*-Sonde markiert. Dagegen wurden die *YPS2*-Fragmente von beiden *C. albicans* Sonden erkannt. Dies deutet darauf hin, dass durch Sequenzunterschiede die verwendeten Sonden nicht an allen spezifischen DNA-Fragmenten gleich stark hybridisierten. Jedoch wurden die meisten detektierten Fragmente in den Genomen von *C. glabrata*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* von allen vier Sonden erkannt. Diese Fragmente könnten den Bereichen um das katalytische Zentrum der Aspartat-Proteasen entsprechen, die hochkonserviert sind. Bei den untersuchten *Candida*-Arten wurden durchschnittlich zwei bis drei Fragmente detektiert, mit denen die meisten Sonden hybridisierten, die auf das Vorhandensein von ein bis drei GPI-Proteasen-homologen Genen hinweisen könnten. Möglicherweise wurden durch die Hybridisierungen aber auch nicht GPI-verankerte Aspartat-Proteasen detektiert.

#### **III.3.4. GEZIELTE ZERSTÖRUNG DER *SAP9*- UND *SAP10*-GENLOZIES**

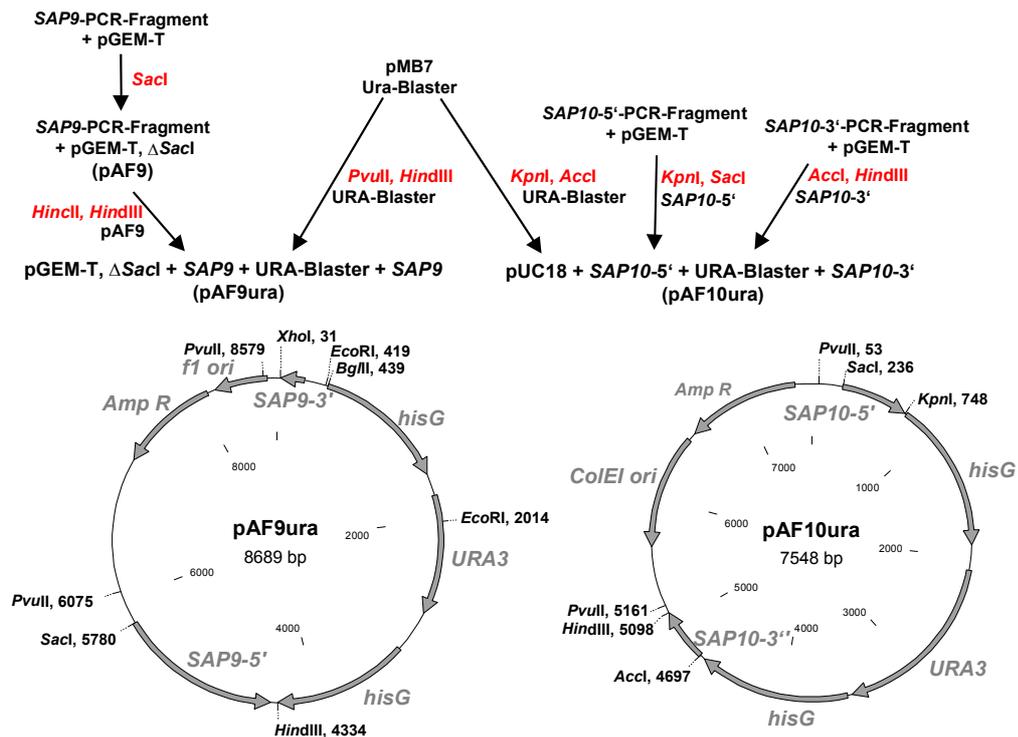
Zur Funktionsanalyse von Sap9p und Sap10p wurden die Gene *SAP9* und *SAP10* sequenziell ausgeschaltet (II.5.2.18.) und die Phänotypen der beiden hergestellten Einzelmutanten untersucht (III.3.5.).

Für das Ausschalten von *SAP9* und *SAP10* wurden die Disruptionskassetten pAF9ura und pAF10ura konstruiert (Abb. 21), welche jeweils die flankierenden Regionen des Gens, unterbrochen von dem sogenannten URA-Blaster, enthielten (II.5.2.18.). Der URA-Blaster besteht aus zwei flankierenden, direkten *hisG*-Sequenzen aus *Salmonella typhimurium* und dem *URA3*-Marker gen aus *C. albicans* mit seinen regulatorischen Einheiten, kloniert in den Vektor pMB7 (II.1.).

Ein 1668 bp langes Fragment mit dem ORF von *SAP9* wurde mit dem Primerpaar 9Sacl / 9XhoI, welche die Restriktionsschnittstellen von Sacl und XhoI enthielten, amplifiziert (Tab. 5, II.5.2.11.). Die PCR wurde mit 200 ng genomischer DNA und *Taq* DNA Polymerase durchgeführt (II.5.2.11.). Das PCR-Produkt wurde in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor kloniert. Da das *SAP9*-Fragment in den erzeugten Plasmiden in zwei Orientierungen vorliegen konnte, wurde jenes Konstrukt herausselektiert, bei dem sich die Vektor- und Insert-spezifischen Sacl-Schnittstellen auf der selben Seite des *SAP9*-Inserts befanden. Dieses Konstrukt wurde als pAF9-Plasmid bezeichnet. Die zwischen den beiden Sacl-Schnittstellen befindlichen Accl-, *Pst*I- und *Hinc*II-Schnittstellen der „Multiple Cloning Site“ (MCS) von pGEM<sup>®</sup>-T wurden nach Restriktion von pAF9 mit Sacl und der anschließenden Religation deletiert. Im nächsten Schritt wurde ein 57 bp großes *Hinc*II- / *Hind*III-Fragment aus der Mitte des *SAP9*-Inserts deletiert. An Stelle dieses 57 bp großen Fragments wurde dann der URA-Blaster, der mit Restriktionsenzymen *Pvu*II und *Hind*III aus dem pMB7-Plasmid geschnitten wurde, eingeführt. Nach der Ligation zweier glatten Enden, die mit Restriktionsenzymen *Pvu*II und *Hinc*II erzeugt wurden, wurden beide Schnittstellen zerstört. Die Disruptionskassette wurde pAF9ura genannt (Abb. 21).

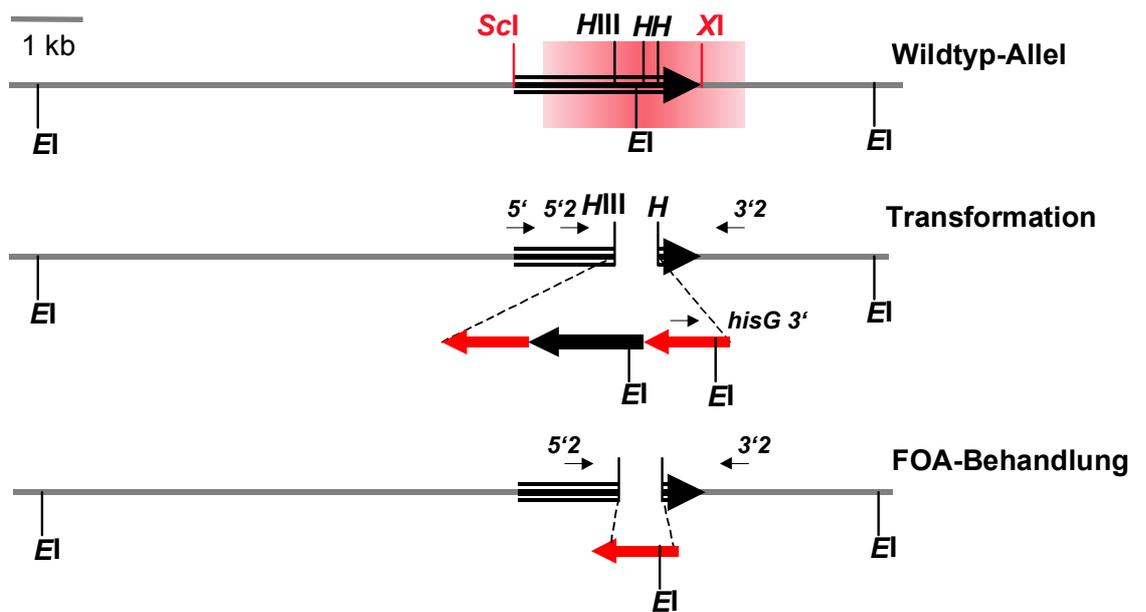
Das pAF10ura-Disruptionsplasmid (Abb. 21) wurde aus drei Fragmenten zusammengesetzt: zwei Fragmente stammten aus dem *SAP10*-Gen und der URA-Blaster wie bei pAF9ura aus pMB7 (Abb. 21). Dafür wurden drei eingeführten *Hind*III-, *Kpn*I- bzw. Sacl- und eine im Gen vorkommende Accl-Schnittstellen benutzt. Die *SAP10*-Fragmente wurden mit Primer-Paaren amplifiziert, die Restriktionsschnittstellen enthielten (II.5.2.11.). Dabei wurden 10Sacl- / 10KpnI-Primer für das am 5'-Ende des Gens gelegene und 10Sacl- / 10HindIII-Primer für das am 3'-Ende gelegene Fragment verwendet (Tab. 5, II.5.2.11.). Die Fragmente wurden unter den gleichen Bedingungen wie das *SAP9*-Fragment amplifiziert (II.5.2.11.). Die jeweils 540 bp und 1348 bp große Produkte wurden in den pGEM<sup>®</sup>-T-Vektor kloniert. Das 5'-Fragment wurde mit den Sacl- und *Kpn*I- Schnittstellen und das 536 bp große 3'-Fragment mit den Accl- und *Hind*III-Schnittstellen aus dem Plasmid

geschnitten. Beide Fragmente wurden aufeinanderfolgend in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von MCS des pUC18-Vektors kloniert. Zum Schluss wurde der URA-Blaster aus pMB7 zwischen den beiden Teilen des *SAP10*-Gens über die *Accl*- und *KpnI*-Schnittstellen eingefügt.

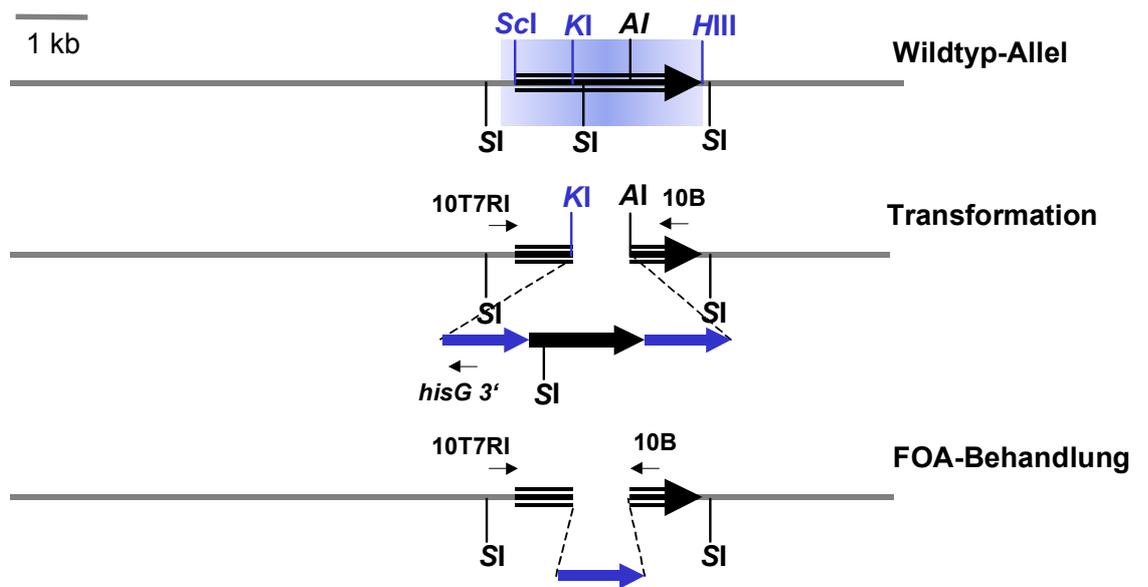


**Abb. 21. Schematische Darstellung der Herstellung von pAF9ura- und pAF10ura-Disruptionskassetten (Erläuterungen im Text).**

Vor der Transformation von *C. albicans* wurde die jeweilige Disruptionskassette mit ihren flankierenden *PvuII*-Schnittstellen freigesetzt. Für die Disruption wurde der *Ura3*<sup>-</sup>-auxotrophe Stamm CA14, ein Derivat des SC5314-Wildtypstammes von *C. albicans* (FONZI & IRVIN, 1993) benutzt. Durch die Integration der Disruptionskassette in eines der beiden Zielallele wurde mit der gleichzeitigen Wiedererlangung der Prototrophie eine Kopie des Zielgens zerstört (Abb. 22). Die positiven Transformanten wurden auf SD-Minimalmedium (II.2.) vorselektiert. Vor der zweiten Transformation wurde das *URA3*-Markergen in den Mutanten durch Behandlung mit 5'-Fluororotat (FOA) deletiert (II.5.2.20.). Das *URA3*-Gen kodiert die Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase, die in der Pyrimidin-Biosynthese die Uridin-



**Ausschalten des *SAP9*-Genes**

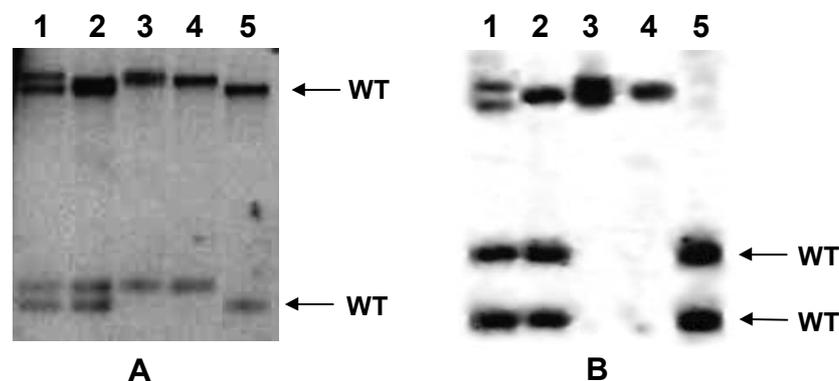


**Ausschalten des *SAP10*-Genes**

**Abb. 22. Schematische Darstellung der gezielten Mutation von *SAP9* und *SAP10* mit dem URA-Blaster.**

Mit der schwarzen Schrift sind die genspezifischen Restriktionsschnittstellen und mit der blauen bzw. roten Schrift die eingefügten Schnittstellen gekennzeichnet. Die Restriktionsenzyme wurden mit folgenden Abkürzungen bezeichnet: AI-AccI, Ei-EcoRI, H-HinclI, HIII-HindIII, Scl-SacI, SI-SspI, XI-XhoI. Das farbige Feld in Höhe des Wildtyp-Allels entspricht dem Hybridisierungsbereich der genspezifischen Sonde. Mit roten bzw. blauen Pfeilen sind die *hisG*-Sequenzen, mit schwarzen Pfeilen das *URA3*-Gen und mit gestreiften Pfeilen die Zielgene gezeichnet.

5'-Monophosphat-Bildung katalysiert. Die Supplementation des Minimalmediums mit dem toxischen Substrathomolog FOA führte zur Selektion von Klonen (II.5.2.20.), bei denen es zu einer spontanen homologen Rekombination zwischen den zwei *hisG*-Sequenzen und damit zur Deletion einer *hisG*-Sequenz und des *URA3*-Gens kam. Die korrekte Integration der Disruptionskassette und die Deletion des Markergens wurden mittels Southern-Blot-Analyse (Abb. 23, II.5.2.12.) und PCR (Abb. 24, II.5.2.11.) überprüft.



**Abb. 23. Southern-Blot-Analyse der  $\Delta sap9$ - (A) und  $\Delta sap10$ -Einzelmutanten (B) nach jedem Mutationsstadium.**

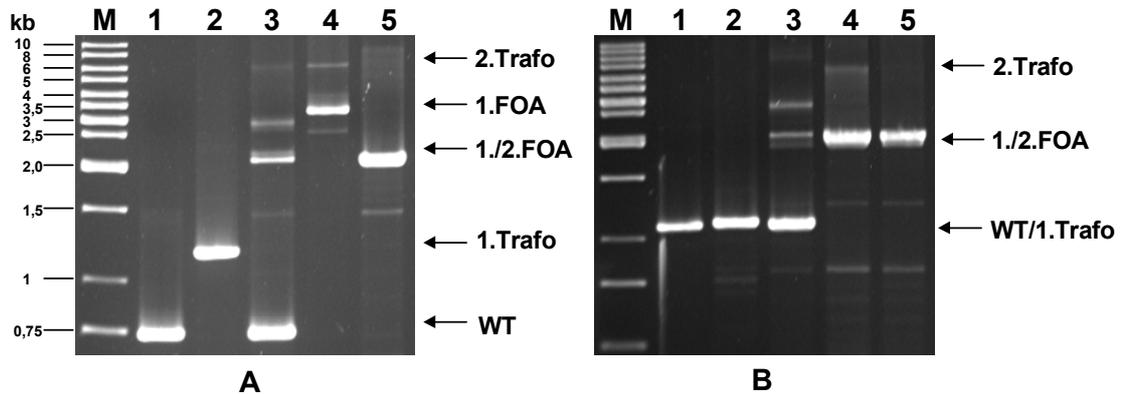
Nach jedem Mutationsstadium änderte sich das Restriktionsmuster der mit *EcoRI* bzw. *SspI* verdauten genomischen DNA der  $\Delta sap9$ - bzw.  $\Delta sap10$ -Mutanten bei der Southern-Blot-Analyse. Der Ausgangsstamm (5) CA14 ergab zwei 6,2 und 0,85 kb große Banden (WT) für den *SAP9*- bzw. ca. 1,0 und 0,7 kb große Banden (WT) für den *SAP10*-Genlocus. Die erste Insertion (1) des *URA*-Blasters führte zum Auftreten zweier zusätzlicher, größerer Fragmente von entsprechend 8,6 und 1,0 kb bzw. 2,5 und 3,0 kb Größe in den beiden  $\Delta sap9$ - bzw.  $\Delta sap10$ -Mutanten. Die gleichen Fragmente traten nach der zweiten Transformation (3) wieder auf. Infolge einer *cis*-Rekombination zwischen zwei *hisG*-Sequenzen (2, 4) wurde eine Größenänderung des 8,6 kb Fragmentes auf 7,2 kb in der  $\Delta sap9$ -Mutante sowie des 3,0 kb Fragmentes auf 2,8 kb in der  $\Delta sap10$ -Mutante beobachtet.

Für den Southern-Blot (Abb. 22, Abb. 23) wurde die genomische DNA von *SAP9*- bzw. *SAP10*-Mutanten entsprechend mit Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *SspI* verdaut. Die auf Nylon-Membran transferierten DNA-Fragmente wurden mit spezifischen *SAP9*- bzw. *SAP10*-Sonden detektiert. Die Sonden wurden in einer PCR mit dem DIG DNA Labeling Kit markiert, bei der die Primepaare *SAP9* 5'3 / 3'2 bzw. *SAP10* 10T7RI / 10HindIII verwendet wurden (Tab. 5, II.5.2.11.). Aus dem erzeugten Banden-Muster lies sich der

Erfolg der Disruption ableiten (Abb. 22, Abb. 23). Der Ausgangsstamm CA14 besaß ein Muster noch nicht mutierter Allele mit je zwei 6,2 und 0,9 kb großen Banden für *SAP9* und zwei 1,0 und 0,7 kb großen Banden für *SAP10*. Nach der Insertion der Disruptionskassetten wurden jeweils *EcoRI*- bzw. *SspI*- Restriktionsschnittstellen in der Genmitte von *SAP9* und *SAP10* deletiert, dafür aber neue mit dem *URA3*-Markergen eingeführt. Dadurch entstanden nach der ersten Transformation neben den Wildtyp-Banden neue, zusätzliche Banden, die größer als die Wildtypbanden waren. So vergrößerten sich die 6,2 und 0,9 kb großen Wildtyp-Banden nach der Integration der Disruptionskassette in das Zielallel in 8,6 und 1,0 kb Banden bei der  $\Delta sap9$ -Mutante und der 0,7 und 1,0 kb Wildtyp-Banden in die vergleichbaren 2,5 und 3,0 kb Banden bei der *SAP10*-Mutante. Die FOA-Behandlung verursachte durch die Deletion einer der beiden *hisG*-Sequenzen und des *URA3*-Gens eine Größenverringering der 8,6 und 3,0 kb großen Fragmente auf 7,2 und 2,8 kb in den jeweiligen *sap9*- und *sap10*-Allelen. Die zweite Transformation führte zum Verlust der Wildtyp-Fragmente und nach der folgenden zweiten FOA-Behandlung waren erneut die Disruptionskassetten-spezifische Fragmente in ihrer Größe reduziert. Um zu überprüfen, dass bei den Transformanden keine unspezifischen Insertionen der Disruptionskassette im Genom erfolgt waren, wurden alle Klone nach jeder Transformation zusätzlich mit der Sonde für den gesamten *URA*-Blaster getestet.

Für die Überprüfung des Disruptionsvorganges mit Hilfe der PCR (II.5.2.11.) wurde nach der ersten Transformation ein außerhalb der Disruptionskassette liegender, genspezifischer Primer *SAP9* 3'2 bzw. *SAP10* 10T7RI und ein *hisG*-spezifischer 3' Primer (Tab. 5, II.5.2.11.) eingesetzt. Damit konnten die Integrationen der Disruptionskassetten am richtigen Genlocus nachgewiesen werden (Abb. 24). Bei richtiger Integration wurde ein *sap9* bzw. *sap10* spezifisches PCR-Produkt von 1184 bzw. 1120 bp erwartet. In den nächsten Mutationsrunden wurden zwei genspezifische Primer benutzt, von denen einer nicht im Bereich der Disruptionskassette lag. Dabei wurde die Größenänderung der amplifizierten Fragmente kontrolliert. Außer den 739

bzw. 1090 bp großen Wildtyp-Fragmenten wurden 1899 bzw. 2382 bp große



**Abb. 24. PCR-Analyse der  $\Delta sap9$ - (A) und  $\Delta sap10$ -Einzelmutanten (B) nach jedem Mutationsstadium.**

Genomische DNA von dem Wildtyp-Stamm (1), nach der ersten (3) und zweiten FOA-Behandlung (5) der  $\Delta sap9$ -Mutante (A) wurde in einer PCR mit den SAP9 3'2 und 5'2 Primer getestet. Dabei wurden die erwarteten 739 bp (1), 739 sowie 1899 bp (3) und 1899 bp (5) großen Fragmente amplifiziert. Nach der zweiten Transformation (4) wurde die korrekte Insertion der Disruptionskassette mit dem SAP9 5' / 3'2 Primerpaar überprüft. Bei einer korrekten Insertion wurden 4907 und 2382 bp großen PCR-Fragmente erzeugt. Für die Fragmentamplifikation in den  $\Delta sap10$ -Mutanten (B) wurde das Primerpaar 10T7RI / 10B angewendet. Mit diesem Primerpaar wurde ein 1090 bp großes Wildtyp-Fragment (1), zwei 1090 und 2382 bp große Fragmente nach der ersten FOA-Behandlung (3), 2382 und 4907 bp Fragmente nach der zweiten Transformation (4) und ein 2382 bp großes Fragment nach der zweiten FOA-Behandlung (5) amplifiziert. Nach der ersten Transformation (2) wurde die Insertion mit dem *hisG* 3'-Primer und dem SAP9 3'2- bzw. 10T7RI-Außenprimer überprüft. Dabei wurden 1184 und 1120 bp große Fragmente in den  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten amplifiziert. Abkürzungen: 1.Trafo / 2.Trafo – Banden nach der ersten / zweiten Transformation, 1. / 2.FOA – Banden nach der ersten / zweiten FOA-Behandlung, WT - Wildtypbanden.

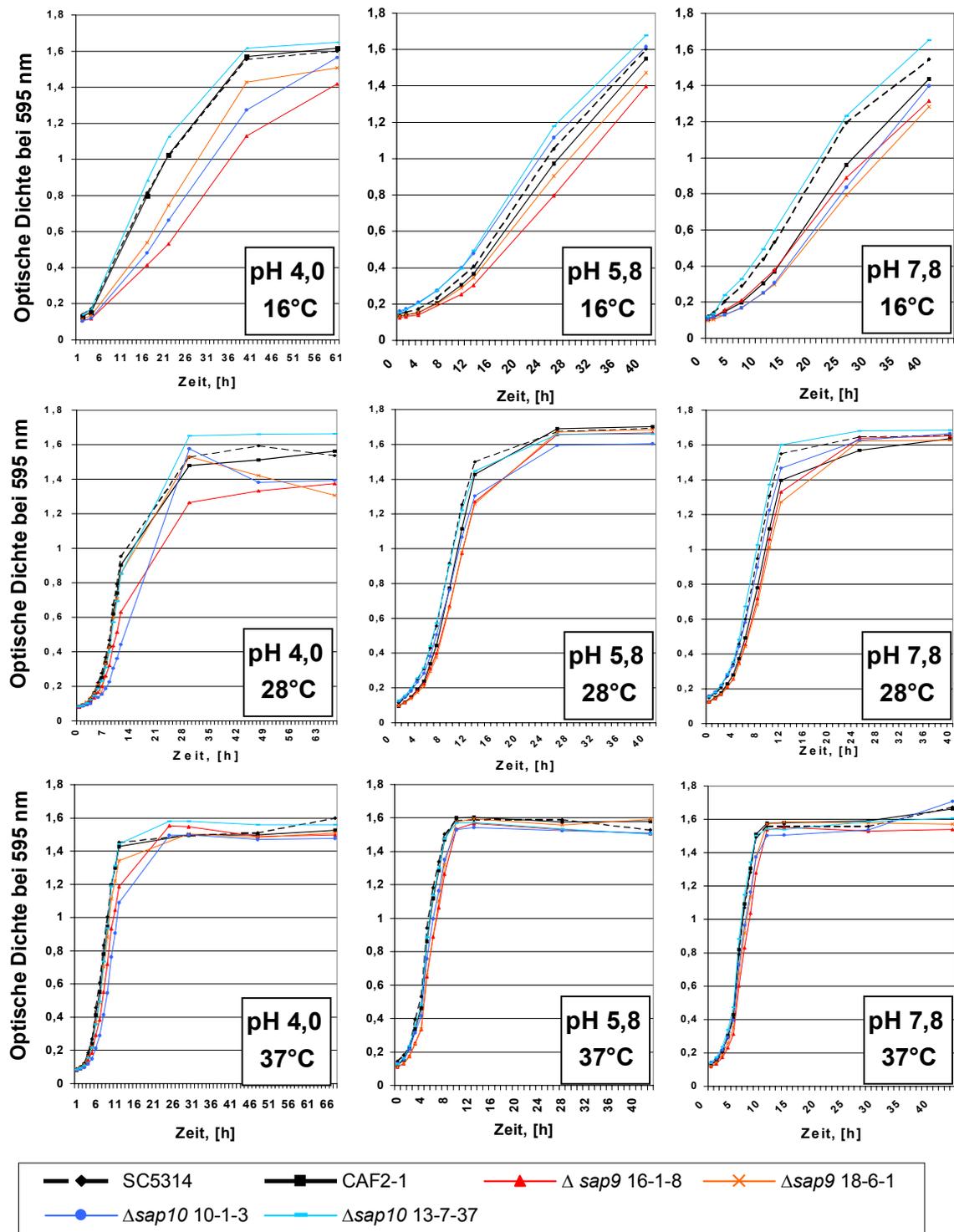
Fragmente nach der ersten FOA-Behandlung mit den Primerpaaren SAP9 3'2 / 5'2 bzw. 10T7RI / 10B (Tab. 5, II.5.2.11.) in der  $\Delta sap9$ - bzw.  $\Delta sap10$ -Mutanten nachgewiesen. Die gleichen Fragmente wurden nach der zweiten FOA-Behandlung detektiert. Nach der zweiten Transformation wurden 5541 und 3216 bp große Fragmente in der  $\Delta sap9$ -Mutante mit dem SAP9 5' / 3'2 Primerpaar sowie 4907 und 2382 bp große Fragmente in der  $\Delta sap10$ -Mutante mit dem 10T7RI / 10B Primerpaar amplifiziert (Tab. 5, II.5.2.11.), wobei die größeren Fragmente dem Allel mit dem vollständigen URA-Blaster und das kleinere Fragment dem mit einer einzigen *hisG*-Kopie entsprachen. Es wurde insgesamt drei isogene Mutanten für die  $\Delta sap9$ -

Einzelmutante (16-1-8, 18-6-1, und 19-1-6) und zwei isogene Mutanten für die  $\Delta sap10$ -Einzelmutante (10-1-3, 19-1-17) nach der ersten Transformation parallel behandelt, um jeweils mehrere unabhängig von einander hergestellte Mutanten zu erhalten.

### III.3.5. PHÄNOTYPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER $\Delta SAP9$ - UND $\Delta SAP10$ -MUTANTEN

Die homozygoten  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten mit einem intakten *URA3*-Gen wurden auf phänotypische Unterschiede unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen untersucht. Zunächst wurden die Mutanten auf Unterschiede im Wachstum in flüssigem YPG-Komplexmedium (II.2.) in 50 ml Kulturen bei 37°C getestet, um eventuellen Schäden vegetativer Funktionen nach den Manipulationen festzustellen. Zum Vergleich wurde außer dem Wildtypisolat SC5314 der CAI4-parentaler CAF2-1 (II.1.) Stamm getestet, der nur ein intaktes *URA3*-Allel enthält, um auszuschließen, dass eventuell beobachtete Abweichungen vom Phänotyp des Wildtyps nicht von einem Gendosierungseffekt des *URA3*-Gens ausgelöst wurden. Während dieses Tests wurden keine Unterschiede zwischen den drei  $\Delta sap9$ -Isogenen (16-1-8, 18-6-1, und 19-1-6), den zwei  $\Delta sap10$ -Isogenen (10-1-3, 19-1-17) und den beiden Kontrollstämmen festgestellt. In weiteren Untersuchungen wurden jeweils zwei Isogene von jeder hergestellten Mutante (16-1-8, 18-6-1, 10-1-3 und 19-1-17) getestet.

Da die beiden Proteine Sap9p und Sap10p sehr ähnlich zu Yps1p und Yps2p von *S. cerevisiae* sind und sich möglicherweise in einer prozessierenden Funktion mit Kex2p überschneiden, wurden die hergestellten  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten auf mögliche  $\Delta kex2$ -ähnliche Phänotypen getestet. Die  $\Delta kex2$ -Mutante von *S. cerevisiae* zeigte einen pH- und kältesensitiven Wachstumsdefekt (KOMANO & FULLER, 1995, OLUWATOSIN & KANE, 1998). Das Wachstum der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten von *C. albicans* wurde



**Abb. 25. Untersuchung des Wachstums der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten auf Temperatur- und pH-Sensitivität in YPG-Flüssigmedium.**

Die Mutanten wurden in ELISA-Platten bei 16, 28 und 37°C bei pH 4,0, 5,8 und 7,8 inkubiert und die Zelldichte in regelmäßigen Zeitabständen bei 595 nm gemessen. Für jeden pH-Wert und jede Temperatur wurden drei Werte gemessen und der daraus ermittelte Mittelwert wurde in den Graphen dargestellt.

sowohl in flüssigem als auch auf festem Medium bei pH-Werten zwischen 4,0 und 7,8 und bei Temperaturen zwischen 16°C und 37°C untersucht. Zu den gewählten pH-Werten 4,0, 5,8, 6,2, 6,8, 7,2, 7,8 wurde das Wachstum in flüssigem YPG-Medium bei 16°C, 22°C, 28°C und 37°C in ELISA-Platten photometrisch bestimmt (II.4.2.). Pro pH-Wert und Temperatur wurden drei Werte gemessen. Der Versuch wurde zwei mal wiederholt. Die aus den Messergebnissen ermittelten Wachstumskurven bei pH 4,0, 5,8 und 7,8 sowie 16°C, 28°C und 37°C sind in der Abbildung 25 dargestellt. Eine leichte Verlangsamung der vegetativen Teilung in der späteren logarithmischen Wachstumsphase und ein leicht verspäteter Eintritt in die stationäre Wachstumsphase waren für die beiden getesteten  $\Delta sap9$ -Isogene im

Stämme	Zelltypen	pH 4,0				pH 5,8				pH 7,8			
		37°C	28°C	22°C	16°C	37°C	28°C	22°C	16°C	37°C	28°C	22°C	16°C
SC5314	Hyphen	4	0	0	0	50	0	0	0	50	7	0	0
	Pseudomyzel	0	2	0	1	0	0	4	0	0	0	2	0
	Opaque-ähnliche	11	6	3	6	0	9	9	11	0	7	2	10
	White	85	92	97	93	50	91	87	89	50	86	96	90
<i>Dsap9</i> 16-1-8	Hyphen	0	0	0	0	7	0	0	0	11	4	0	0
	Pseudomyzel	12	1	1	0	27	0	2	0	5	0	2	0
	Opaque-ähnliche	30	33	27	42	30	15	37	28	29	54	17	60
	White	58	66	72	58	36	85	61	72	55	42	81	40
<i>Dsap10</i> 10-1-3	Hyphen	10	0	0	0	5	11	0	0	2	3	0	0
	Pseudomyzel	3	3	3	0	3	0	1	0	4	0	2,5	0
	Opaque-ähnliche	34	50	35	50	0	2	2	6	18	12	2,5	3
	White	56	47	62	50	92	87	97	94	76	85	95	97

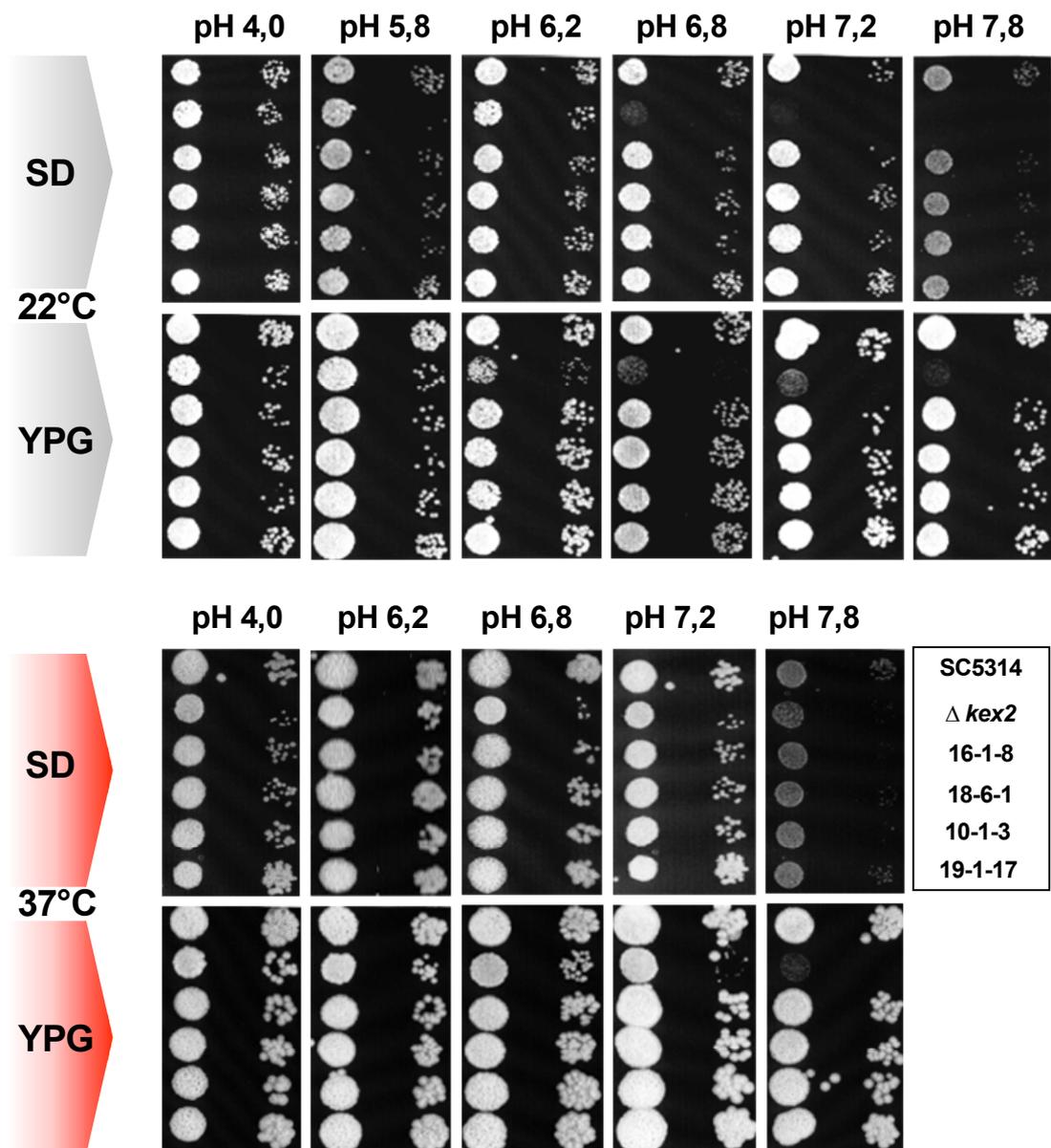
**Tab. 12. Untersuchung der Morphologie der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten nach Wachstum in YPG-Flüssigmedium bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten.**

Die in der Tabelle eingetragenen Zahlen entsprechen prozentualen Angaben. Aufgeführt sind exemplarische Untersuchungen mit jeweils einer  $\Delta sap9$ - (16-1-8) und einer  $\Delta sap10$  (10-1-3) Mutante. Beide Mutanten bildeten im Vergleich zum Stamm SC5314 gehäuft „opaque“-ähnliche Hefezellen, sowie markant weniger Myzel bei 37°C und pH-Werten über 5,8. Die „opaque“-ähnlichen Formen wurden in den Kulturen bei pH 4,0 der  $\Delta sap10$ -Mutanten und bei allen getesteten Bedingungen für die  $\Delta sap9$ -Mutante registriert. Die weiteren  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutantenstämme ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Vergleich zu den Kontroll-Stämmen SC5314 und CAF2-1 und den  $\Delta sap10$ -Isogenen unter den meisten Bedingungen zu beobachten. Dieses war bei niedrigeren Temperaturen, vor allem bei 16°C deutlicher als bei 37°C. Nach Beendigung des Wachstumsversuches in den Flüssig-Kulturen wurden die Zellmorphologien in den Zellsuspensionen untersucht (Tab. 12). Die Zellen des SC5314-Stammes bildeten bei niedrigen Temperaturen (16°C-28°C) und sauren pH-Werten unter 6,2 ausschließlich die Hefeform. Bei 37°C und allen pH-Werten, sowie 28°C und pH 7,8 wurde Hyphen-Bildung beobachtet. Die  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten entwickelten etwas kürzere Hyphen. Dabei war eine Verkürzung der Hyphen bei den  $\Delta sap9$ -Mutanten deutlicher zu erkennen als bei den  $\Delta sap10$ -Mutanten. Die Mutationen beeinflussten nicht nur die Länge der Hyphen, sondern auch die Morphologie der Zellen. Die beiden Mutanten bildeten wesentlich weniger Myzelzellen unter den untersuchten Bedingungen als der Wildtypstamm SC5314 (Tab. 12). Am stärksten waren die Veränderungen bei den  $\Delta sap9$ -Mutanten zu sehen. Als Hefe bezeichnete Zellformen konnten in Anlehnung der beiden „Switching“-Formen des Stammes WO-I (SOLL *et al.*, 1997) auf zwei Typen differenziert werden: längliche, größere „opaque“-ähnliche und runde, kleinere „white“-ähnliche Formen. Dabei wurden die „opaque“-ähnlichen Zellen in den  $\Delta sap9$ -Zellkulturen bei allen pH-Werten und in den  $\Delta sap10$ -Zellkulturen bei pH 4,0 viel öfter beobachtet als in den Kulturen der Wildtypstämme (Tab. 12). Beim wiederholten Wachstumstest wurden die Wachstumsverzögerung in der späteren logarithmischen Wachstumsphase und die Veränderungen in der Zellform bei  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten wieder beobachtet.

Auf YPG- und SD-Festmedien (II.2.) wurde das Wachstum der Mutanten bei den gleichen pH-Werten wie im flüssigen Medium bei 22°C und 37°C getestet (Abb. 26). Zusätzlich zu dem Wildtypstamm SC5314 wurde die  $\Delta kex2$ -Mutante von *C. albicans* (NEWPORT & AGABIAN, 1997) als Referenzstamm gewählt. Wie die  $\Delta kex2$ -Mutante von *S. cerevisiae* (OLUWATOSIN & KANE, 1998) zeigte die  $\Delta kex2$ -Mutante von *C. albicans* bei pH-Werten über 6,8 ein deutlich schlechtes Wachstum, das bei 22°C stärker

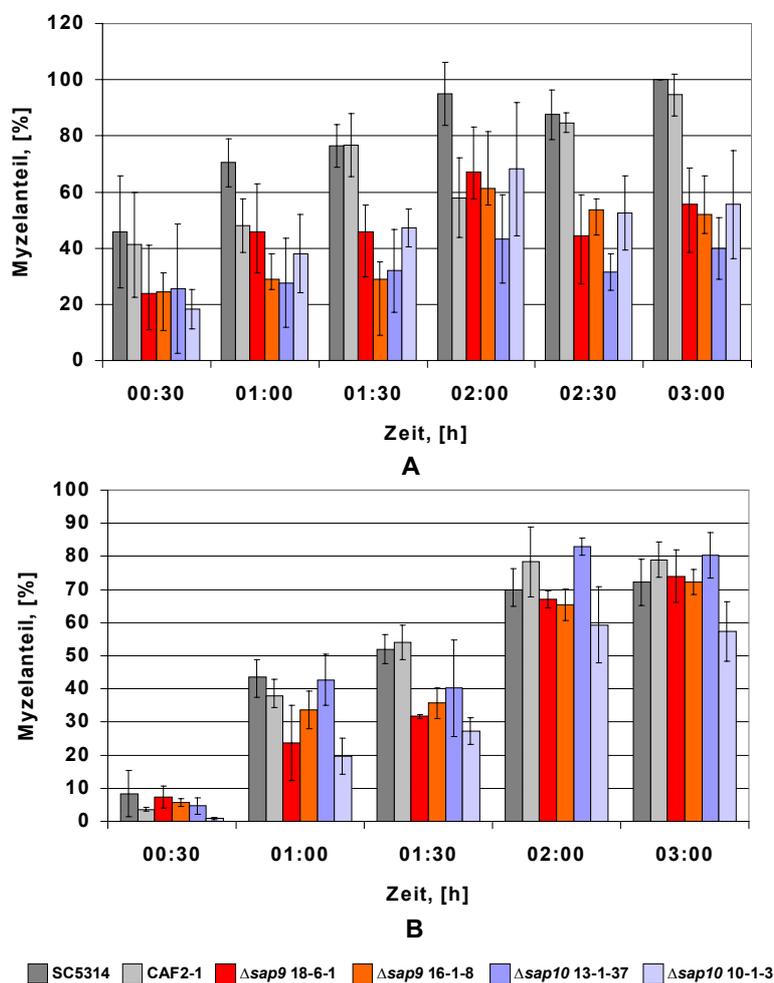
ausgeprägt als bei 37°C war. Zwischen dem Referenzstamm SC5314 und den beiden  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten war kein deutlicher Wachstumsunterschied auf dem Festmedium festzustellen.



**Abb. 26. Untersuchung der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten auf Temperatur- und pH-Sensitivität auf SD- und YPG-Festmedium.**

Das Wachstum der Mutanten wurde bei 22°C und 37°C sowie pH-Werten zwischen 4,0 und 7,8 auf YPG-Komplex- und SD-Minimal-Medium getestet. Die Bilder sind nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und nach 72 Stunden Inkubation bei 22°C entstanden. Für den Tropfentest wurden jeweils 10  $\mu$ l Zellsuspension mit 10<sup>5</sup> (linke Reihe) und 10<sup>4</sup> (rechte Reihe) Zellen / ml auf das Nährmedium aufgetragen.

Der Morphologiewechsel von der Hefe- zur Myzelform bei den beiden Mutanten und den Referenzstämmen CAF2-1 und SC5314 wurde in flüssigen 5%igem FCS- und Lee's-Medien (I.1.1.1., II.2., II.4.3.) untersucht (Abb. 27). Die Myzelinduktion bei den Mutanten war in 5%igem FCS-Medium vermindert. Schon nach 30 min Inkubation lagen 56% bzw. 46% der Zellen der Referenzstämmen SC5314 bzw. CAF2-1 als Hyphen vor, wobei nur 18-26% der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutantenzellen Myzel bildeten. Gleichzeitig ließen sich in myzelinduzierendem Lee's-Medium die Mutanten wenig von

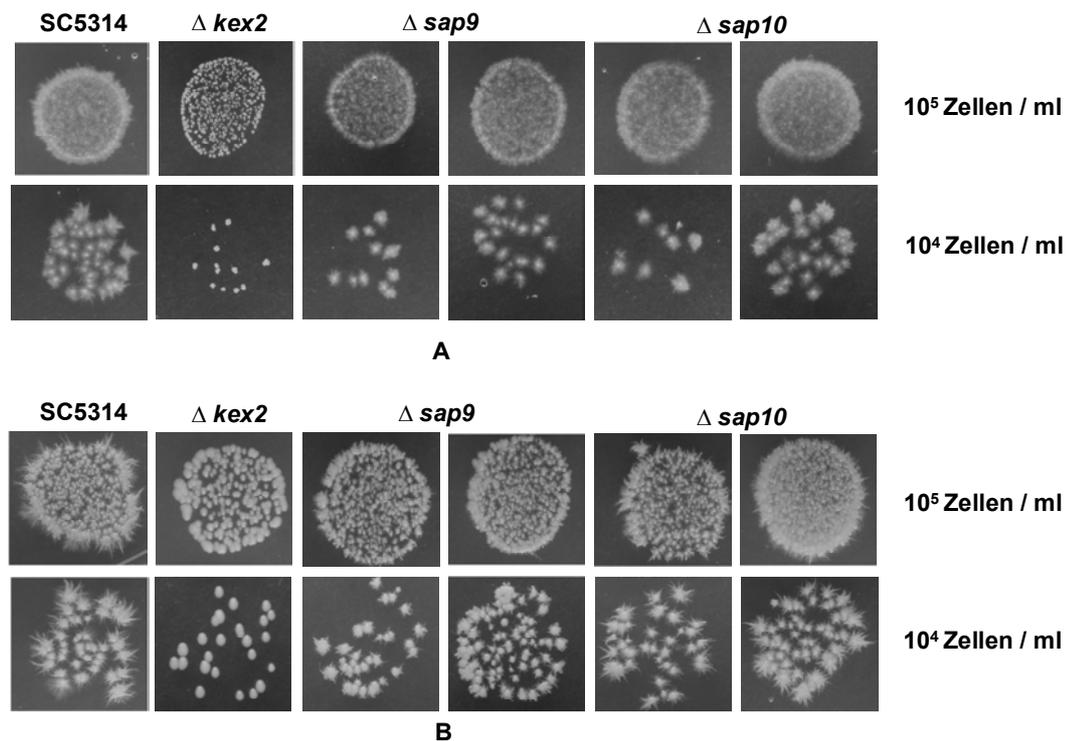


**Abb. 27. Myzelbildung der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten in 5% FCS (A) und Lee's (B) Flüssigmedien.**

Die Myzelinduktion bei den  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten wurde mit  $10^7$  Zellen / ml und bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Proben wurden in dreißigminütigen Intervallen für die mikroskopische Bestimmung der Zellform entnommen. Die Hefe- und Myzelzellen wurden in fünf Kleinquadrate der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt und der prozentuale Gehalt an Myzelzellen bestimmt. Aus fünf ermittelten Werten wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet.

den Wildtypstämmen unterscheiden. Die leichte Verzögerung in der Auskeimung während der ersten zwei Stunden glich sich bei den Mutanten nach drei Stunden aus. Die Wachstumstests in den Myzel-induzierenden Flüssigmedien wurden jeweils ein Mal durchgeführt.

Für die Untersuchung der Myzel- und Proteasen-induktion auf Festmedien wurden Zellsuspensionen von  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Zellen / ml auf 5%igen FCS und YCB / BSA Platten getropft (II.2., II.4.2.) und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (Abb. 28). In 0,5% BSA-haltigem Medium verhielten sich die  $\Delta sap10$ -Mutanten ähnlich wie der SC5314-Stamm. Die  $\Delta sap9$ -Mutanten zeigten nur ein geringfügig langsames Wachstum. Deutlich langsamer wuchs die zum Vergleich aufgetragene  $\Delta kex2$ -Mutante, welche ein reduziertes Niveau sekretierter Proteasen und eine anormal prozessierte Sap2p-Protease aufweist (NEWPORT & AGABIAN, 1997). Auf 5%igem FCS-Medium zeigte die  $\Delta kex2$ -

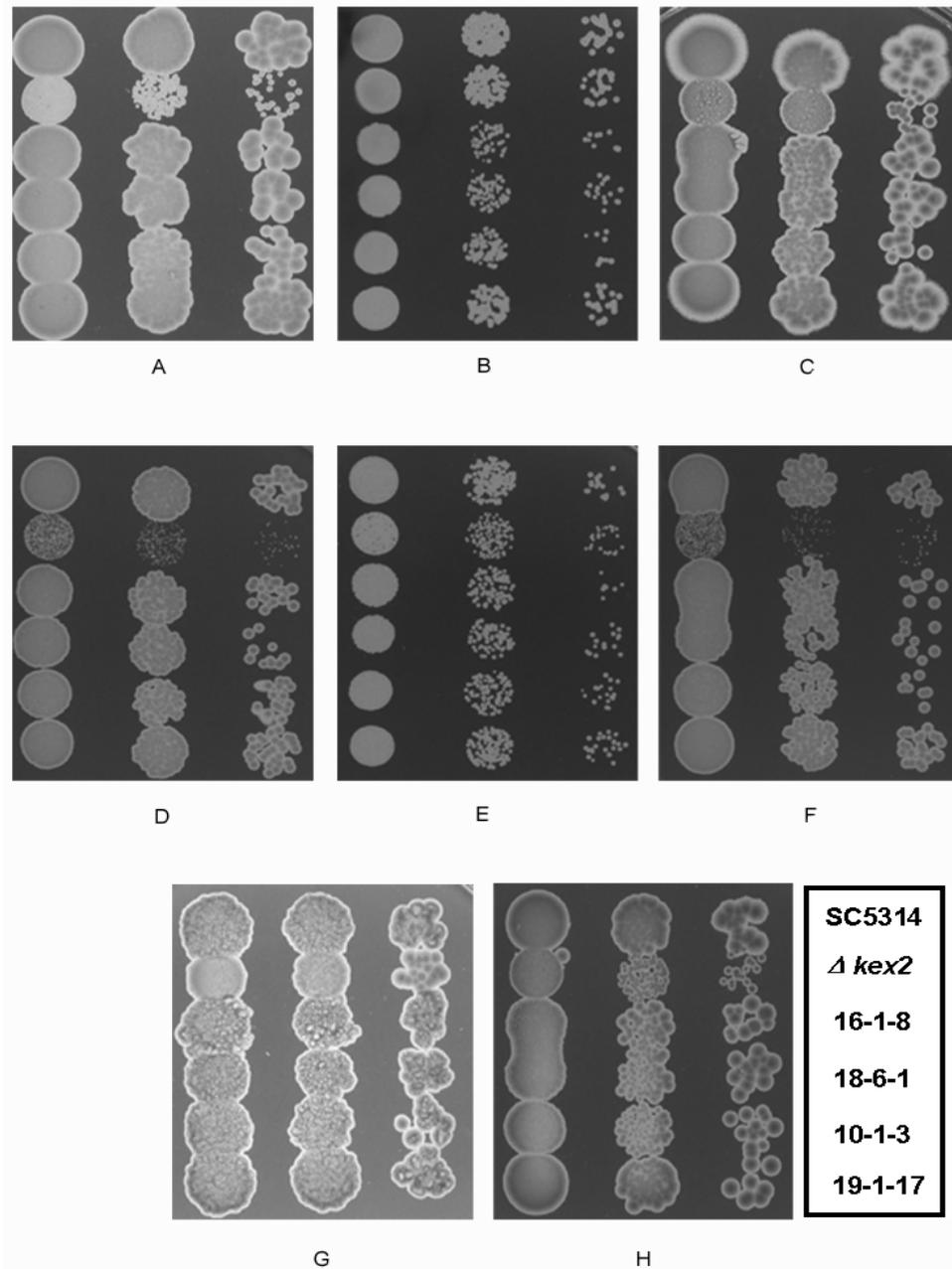


**Abb. 28. Morphologiewechsel der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten beim Wachstum auf YCB / BSA (A) und 5% FCS (B) Festmedien.**

Zehn  $\mu\text{l}$  Zellsuspensionen mit jeweils  $10^5$  und  $10^4$  Zellen / ml wurden auf die YCB / BSA- und 5% FCS-Platten getropft. Die Myzelentwicklung der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten wurde im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314 und der  $\Delta kex2$ -Mutante, die keinen Hyphen bilden kann, bei  $37^\circ\text{C}$  induziert. Nach 5 Tagen Inkubation wurde eine starke Ausbildung der Hyphen, besonders bei dem Wildtypstamm, beobachtet.

Mutante eine stark reduzierte Fähigkeit Myzel zu bilden (NEWPORT & AGABIAN, 1997). Auf dem gleichen Myzel-induzierenden Medium zeigten die  $\Delta sap9$ -Mutanten schwächere Myzelbildung als der Wildtypstamm. Dies war besonders für die Zelldichte  $10^5$  und  $10^4$  Zellen / ml charakteristisch. Bei den  $\Delta sap10$ -Mutanten war die Störung in der Myzelbildung weniger ausgeprägt. Die beobachteten Phänotypen konnten bei den wiederholten Platten-Tropfchentests reproduziert werden.

Die  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten wurden im Vergleich zu dem Wildtypstamm SC5314 und der  $\Delta kex2$ -Mutante im Tropfentest (II.4.2.) auf das Vermögen verschiedene Kohlenstoffquellen zu verwerten getestet. Dafür wurden YPD-Medien mit dem Disaccharid Galactose und dem Trisaccharid Rafinose jeweils in Konzentrationen von 5% und 2% hergestellt (II.2.). Außerdem wurden die Mutanten einem osmotischen Schock auf Festmedien mit den folgenden osmotisch aktiven Substanzen ausgesetzt: 7% Glycerol, 3% Glycerol mit 2% Kaliumacetat in SD und YPG, 2% Galactose und 3% Glycerol, 5%, 6% sowie 7% Sorbitol und 1 M sowie 1,25 M Natriumchlorid in SD (II.2.). Ausgewählte Platten sind in der Abbildung 29 dargestellt. Das Wachstum auf diesen Medien wurde sowohl bei 37°C als auch 22°C getestet. Unter den getesteten Bedingungen waren nur leichte Wachstumsunterschiede zwischen den  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten und dem Wildtyp zu registrieren. Beim Wachstum auf dem YPG-Komplexmedium mit 5% Sorbitol war bei 22°C Myzelbildung nach fünf Tagen Inkubation zu beobachten. Wie schon in den früheren Versuchen gezeigt wurde, entwickelten sich die Hyphen bei den  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten weniger stark als beim Wildtypstamm (Abb. 29C). In den durchgeführten Wachstumstests erwies sich die  $\Delta kex2$ -Mutante, nicht aber die  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten, als empfindlich gegenüber den hyperosmotischen Bedingungen und konnte schlecht Galactose und Rafinose verwerten.



**Abb. 29. Untersuchung der  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten auf osmotische Sensitivität und Verwertung der komplexen Kohlenstoffquellen.**

Beim Wachstum auf YPG mit 2% Kaliumacetat und 3% Glycerol bei 37°C (A), SD mit 2% Kaliumacetat und 3% Glycerol bei 37°C (B), YPG mit 5% Sorbitol bei 37°C (C), YPG mit 2% Kaliumacetat und 3% Glycerol bei 22°C (D), SD mit 2% Galactose und 3% Glycerol bei 22°C (E) sowie YPG mit 5% Sorbitol bei 22°C (F) wurde die Resistenz gegen den osmotischen Schock getestet. Auf YPD mit 5% Galactose (G) und YPD mit 2% Raffinose (H) wurde die Fähigkeit der Mutanten Disaccharide bzw. Trisaccharide verwerten zu können getestet. Die Reihenfolge der aufgetropften Zellsuspensionen entspricht der in der Abb. 26. (von oben nach unten): Wildtypstamm SC5314,  $\Delta kex2$ -Mutante,  $\Delta sap9$  16-1-8-,  $\Delta sap9$  18-6-1-,  $\Delta sap10$  10-1-3- und  $\Delta sap10$  19-1-17-Mutanten. Auf die Platten wurden je 10  $\mu$ l Tropfen der Zellsuspension von den drei Verdünnungen mit jeweils  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  Zellen / ml aufgetragen.

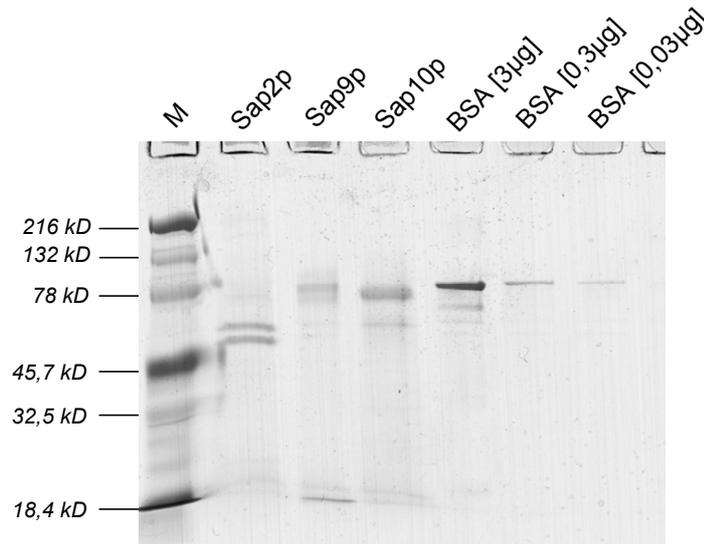
### **III.4. Untersuchung der proteolytischen Eigenschaften von Sap9p und Sap10p**

Nachdem die Expressionseigenschaften von *SAP9* und *SAP10* (III.1., III.3.2.) sowie die Mutanten dieser Gene auf phänotypische Veränderungen (III.3.5.) untersucht worden waren, wurde das Projekt auf die Untersuchung der proteolytischen Eigenschaften der von diesen Genen kodierten Proteine erweitert. In diesem Abschnitt wurden Aktivitätsoptimum und Substratspezifität unter optimierten Bedingungen von Sap9p und Sap10p bestimmt. Als Referenz wurde für diese Versuche die Protease Sap2p gewählt.

#### **III.4.1. EXPRESSION VON *SAP9* UND *SAP10* IN *P. PASTORIS***

Für die Untersuchung der Eigenschaften von Sap9p und Sap10p im Vergleich zu Sap2p wurden diese drei Proteasen aus den Kulturüberständen von *P. pastoris* isoliert. Die *P. pastoris* Klone (II.1.) mit den rekombinanten, ins Genom integrierten Genen *SAP2*, *SAP9* und *SAP10* wurden im Induktionsmedium sechs Tage inkubiert (II.5.3.1.). Nach Bradford bestimmte Konzentration des Proteins im Kulturüberstand (II.5.3.3.) für Sap2p, Sap9p und Sap10p war entsprechend 34, 14 und 22 ng /  $\mu$ l. Die Konzentration und die Reinheit des Proteins im Überstand wurden zusätzlich in einem 7-12% Tris-HCl-Gradienten SDS-PAGE-Gel kontrolliert. Die Kulturüberstände wurden direkt auf das Gel aufgetragen (II.5.3.1., II.5.3.2.). Als Konzentrationsstandard wurden jeweils 3, 0,3 und 0,03  $\mu$ g BSA auf das Gel aufgetragen (Abb. 30). Nach dem Auftrennen (II.5.3.2.) wurde das Gel in Coomassie blau gefärbt (II.5.3.2.). Beide Proteasen besaßen ein höheres Molekulargewicht als Sap2p, das bei ca. 65 kD für Sap9p und 70 kD für Sap10p lag. Ein diffuser Bandenverlauf von Sap9p und Sap10p sowie ein stark nach der geschätzten theoretischen molekularen Masse (ca. 43 kD) abweichendes Laufverhalten für Sap10p kann auf eine starke Glykosylierung zurückführen. Das Sap2p-Expressionsprodukt ergab zwei Banden, die als

Resultat einer partiellen Prozessierung in *P. pastoris* zustande gekommen sein könnte (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1998). Die Konzentration der Proteasen im Überstand wurde anhand des Protein-Gels proportional höher als die photometrisch bestimmte geschätzt. Sie betrug jeweils ca. 130, 40 und 120 ng /  $\mu$ l für Sap2p, Sap9p und Sap10p.



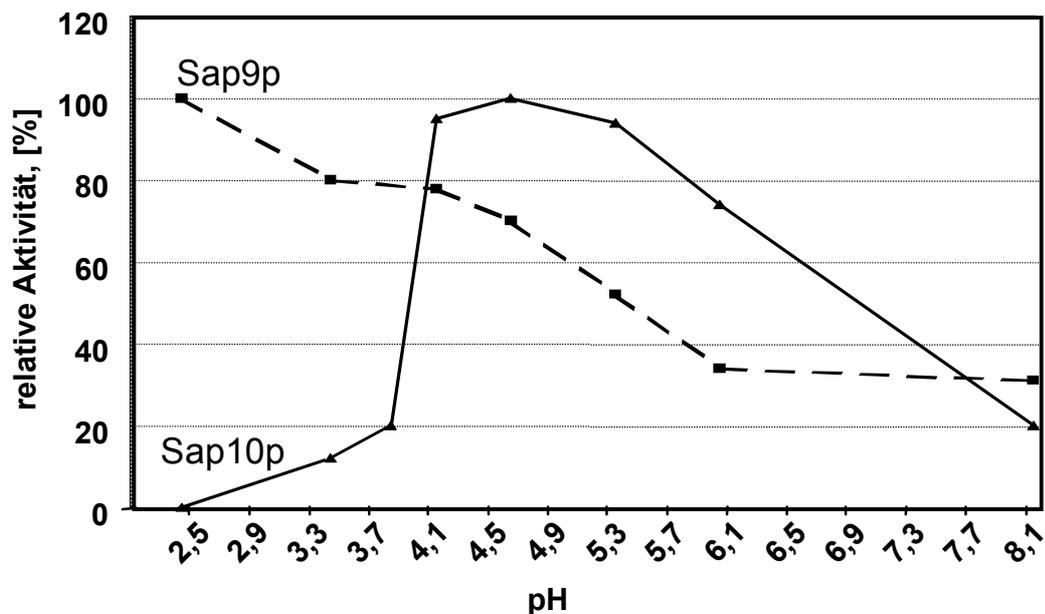
**Abb. 30. Elektrophoretische Auftrennung von Sap2p, Sap9p und Sap10p aus den Kulturüberständen von *P. pastoris*.**

Jeweils 7,5  $\mu$ l von dem Kulturüberstand wurden pro Spur des 7-12% Tris-HCl-Gradienten SDS-PAGE-Gels beladen. Das Gel wurde mit Coomassie blau gefärbt. Der Marker enthielt die Banden folgender Größen: Myosin, 216 kD;  $\beta$ -Galactosidase, 132 kD; BSA, 78 kD; Carbonanhydrase, 45,7 kD; Sojabohnen Trypsin-Inhibitor, 32,5 kD und Lysozym, 18,4 kD.

#### III.4.2. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON SAP9P UND SAP10P

Die Bestimmung der Protease-Aktivität wurde mit Hilfe des Hämoglobintests (II.5.3.4.) durchgeführt. Das Aktivitätsoptimum wurde bei folgenden pH-Werten getestet: 2,3, 2,7, 3,3, 3,7, 4,0, 4,5, 4,8, 5,2, 5,5, 5,9 und 8,0, die mit 0,1 M Citronensäure und 0,1 M Natriumcitrat eingestellt worden waren (II.3.). Die Protease-Konzentration betrug in allen Reaktionsansätzen 1  $\mu$ g / ml. Zum Vergleich wurde die Aktivität von Sap2p bei den gleichen pH-Werten gemessen. Die maximale Aktivität wurde nach 30 min Reaktion bei pH 3,0 gemessen. Das bestimmte pH-Aktivitätsoptimum stimmte annähernd mit dem publizierten Aktivitätsoptimum von Sap2p bei pH 3,5 (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1998) überein. Der Reaktionsdauer für die Aktivitätsbestimmung von

Sap9p- und Sap10p-Isoenzymen wurde auf eine Stunde verlängert, weil die Aktivität zu den früheren Zeitpunkten nicht messbar war. Dabei wurde die maximale Aktivität von Sap9p und Sap10p bei pH 2,3 und 4,5 gemessen (Abb. 31).



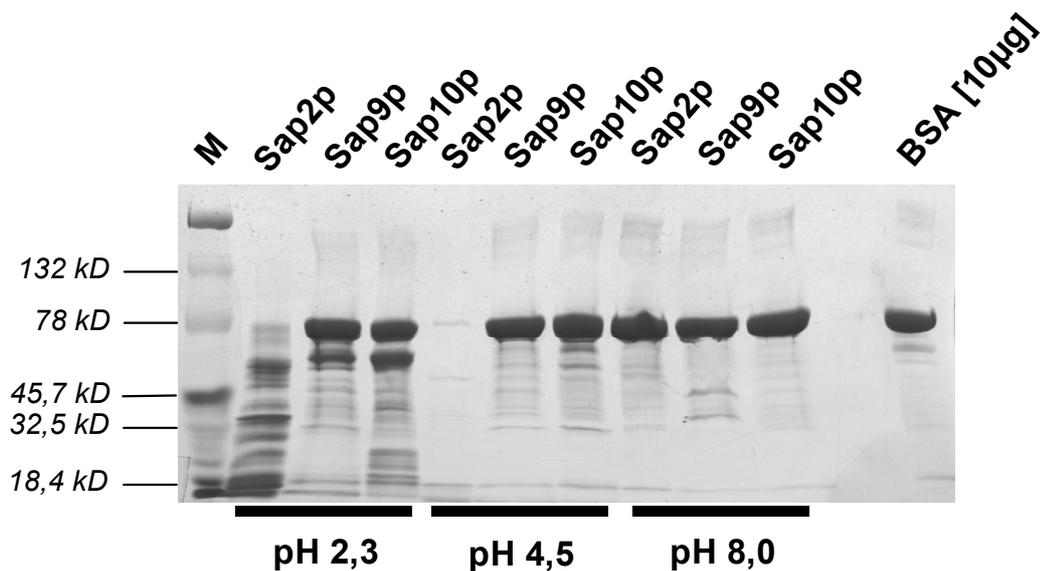
**Abb. 31. Bestimmung der maximalen, enzymatischen Aktivität der Sap9p- und Sap10p-Isoenzyme im Test mit 1% Hämoglobin.**

Die Aktivität der Isoenzyme wurde im Citrat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten getestet. Die relativen Aktivitäten wurden als prozentuale Werte der Aktivität bei optimalen pH dargestellt.

### III.4.3. BESTIMMUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄT VON SAP9P UND SAP10P

Die von *C. albicans* sekretierten Aspartat-Proteasen finden im Wirtsorganismus viele Substrate. Experimentell wurden zahlreiche Wirtsproteine verschiedener Gewebetypen, wie Mucin, Collagen, Prothrombin, Koagulationsfaktor X,  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Immunglobulin A, Keratin, Cystatin A und Serumalbumin als mögliche Zielsubstrate der Sap-Isoenzyme festgestellt (RÜCHEL *et al.*, 1983, 1984, 1986, RAY & PAYNE, 1990, KAMINISHI *et al.*, 1994, TSUSHIMA *et al.*, 1994, GOLDMAN *et al.*, 1995, TSUSHIMA & MINE, 1995, COLINA *et al.*, 1996). Sap9p und Sap10p nehmen

möglicherweise eine Sonderstellung unter den Sap-Isoenzymen ein, da sie vermutlich einen anderen Funktionsbereich als die anderen Proteasen dieser Isoenzymfamilie haben. Die Substratspezifität von Sap2p, Sap9p und Sap10p wurde im Citrat-Puffer bei pH 2,3, 4,5 und 8,0 bestimmt (Abb. 32). Dabei wurden die optimalen pH-Bedingungen der getesteten Proteasen berücksichtigt. Für den Test wurde Serumalbumin als Substrat gewählt, das als mögliches Zielprotein von Sap-Proteasen hydrolysiert werden kann (TSUSHIMA & MINE, 1995). Im Gegensatz zu Sap2p hydrolysierten Sap9p und Sap10p BSA auch unter optimalen Bedingungen nur geringfügig.



**Abb. 32. BSA-Hydrolyse von Sap2p, Sap9p und Sap10p bei pH 2,3, 4,5 und 8,0.** Die Proteine wurden im 7-12% Tris-HCl-Gradienten SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit Coomassie blau gefärbt. Pro Spur wurden 7,5 µl der Reaktionsansätze aufgetragen, die 10 µg BSA enthielten. In der letzten Spur wurden 10 µg unbehandeltes BSA beladen. Der aufgetragene Marker siehe II.5.3.2..

Die höchste Aktivität hatten beide Proteasen bei pH 2,3. Dabei entstand sowohl bei Sap9p als auch bei Sap10p eine distinkte Bande, die etwas kleiner als die BSA-Bande war und einer ca. 55 kD großer Bande entsprach. Eine Bande dieser Größe ist allerdings auch schwach in der Spur mit dem unverdauten BSA zu sehen. Es könnte sich dabei sowohl um eine chemische als auch um eine enzymatische Degradation von BSA handeln. Eine enzymatische Degradation könnte ein Hinweis auf eine spezifische Spaltung des BSA-Substrates von beiden GPI-Proteasen sein, die möglicherweise wie

---

prozessierende Kex2p und Yapsine von *S. cerevisiae* bestimmte Erkennungssequenzen erkennen könnten. Das BSA besitzt zwei Lysin-Lysin und eine Arginin-Lysin dibasische Erkennungssequenzen. Im Fall einer spezifischen Spaltung von Sap9p bzw. Sap10p an diesen Sequenzen können Peptide mit den theoretischen Molekulargewichten von 18 und 52 kD oder 63 und 7 kD oder auch 50 und 20 kD entstehen. Gleichzeitig degradierte Sap2p das BSA bei dem gleichen pH, das nicht dem Aktivitätsoptimum des Enzyms entsprach, in wesentlich kleinere Fragmente. Bei dem optimalen pH-Wert 4,5 für die Sap2p-Aktivität wurde das gesamte BSA in kleine Peptide verdaut. Bei pH 8,0 wies keine der Proteasen eine bemerkbare Aktivität auf.