

IV.

DISKUSSION

IV. 1 Sekretorische Aspartat-Proteasen als Pathogenitätsfaktor

IV.1.1. DEFINITION DER VIRULENZDETERMINANTEN

Eine der Kernfragen in der Forschung an dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* ist die Untersuchung der Virulenzfaktoren und die Auswirkung einzelner Gene auf die Pathogenität des Pilzes. Zu Pathogenität und Virulenz tragen viele verschiedene Faktoren bei, die in der Literatur jedoch unterschiedlich definiert werden. Von ODDS *et al.* (2001) werden diejenigen Gene zu den Virulenzdeterminanten zugeordnet, deren Produkte für die Virulenz essentiell sind und direkt mit den Wirtszellen interagieren. NAVARRO-GARCIA *et al.* (2001) hingegen bezeichneten nicht nur Aktivitäten, die für ein bestimmtes Stadium eines Infektionsprozesses wichtig sind als putative Virulenzfaktoren, sondern auch einige Metabolismus-Gene, die für die Vitalität des Pilzes notwendig sind und somit auch für die Etablierung einer Infektion benötigt werden. HAYNES (2001) präziserte die Definition der Virulenzdeterminanten und legte drei Kriterien zu Grunde: (1) putative Funktion des kodierten Proteins, (2) Expressionsprofil des Gens und (3) Vitalität der Mutante sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Er schlug in seiner Definition vor, dass diejenige Gene, die primär *in vivo* exprimiert werden, das Überleben des Pilzes gewährleisten und somit zur Proliferation und Pathogenität des Pilzes in oder auf dem Wirt beitragen.

IV.1.2. PUTATIVE FUNKTION DER SAP-PROTEASEN

IV.1.2.1. SAP1P-SAP8P

Sekretorische Aspartat-Proteasen sind schon lange als Virulenzfaktor des Pathogens *C. albicans* anerkannt worden (STAIB, 1965, MACDONALD & ODDS, 1980, ODDS, 1988, CUTLER, 1991). Die Sekretion von Sap-Proteasen wurde nicht nur in Kultur nachgewiesen (STAIB, 1965, REMOLD *et al.*, 1968), sondern konnte auch während invasiver Infektionen mit Antikörpern gegen *Candida*-Proteasen im Enzym-Immunoassay gemessen werden (MACDONALD & ODDS, 1980, RÜCHEL, 1991). Die Proteasen werden offensichtlich von den Pilzzellen sezerniert um eine Aminosäuren-Mangel Situation in oder auf dem Wirt

mittels Abbau von Wirtsproteinen zu kompensieren. Wenn das Wachstumsmedium einfache stickstoffhaltige Substanzen, wie Aminosäuren oder Peptide, enthielt, wurde nur eine geringe Enzymsekretion nachgewiesen. Sie stieg an, wenn Proteine die einzige Stickstoffquelle im Medium darstellten (CRANDALL & EDWARDS, 1987). Eine Reduktion der *SAP2* mRNA wurde nach der Zugabe von Aminosäuren in das Wachstumsmedium beobachtet (HUBE *et al.*, 1994). Eine wichtige Rolle für Sap-Proteasen bei frühen Infektionsstadien wurde in *in vivo* Studien mit dem Aspartat-Proteasen Inhibitor - Pepstatin A gezeigt. Alle mit Pepstatin A vorbehandelten intranasal infizierten Mäuse überlebten *Candida*-Infektion im Vergleich zu nicht behandelten Tieren (FALLON *et al.*, 1997). Gleichzeitig zeigte bei den i. v. infizierten Mäusen die Behandlung mit Pepstatin A keine deutliche Wirkung, was auf die funktionale Bedeutung der Saps für das Durchbrechen der epithelialen Barriere hinwies (FALLON *et al.*, 1997). Sekretorische Aspartat-Proteasen zeigen ein breites Spektrum in der Substratspezifität. Es konnte die Degradation zahlreicher histologisch unterschiedlicher Wirtsproteine durch Sap-Proteasen gezeigt werden: Keratin (RAY & PAYNE, 1990), Kollagen (GOLDMAN *et al.*, 1995), Mucin (COLINA *et al.*, 1996), Laminin, Fibronectin, Serumalbumin (RAY & PAYNE, 1991), Hämoglobin (RÜCHEL, 1981), Immunglobulin IgA (RÜCHEL, 1986), α_2 -Makroglobulin (RÜCHEL & BÖNING, 1983). Die Proteasen könnten potentiell unterschiedliche Körperfunktionen des Wirtsorganismus beeinflussen und als Folge zu deren Dysfunktion führen. Es wurde experimentell gezeigt, dass Sap-Proteasen Interleukin IL-1 β aktivieren und damit die inflammatorische Antwort im Epithelium anregen können (BEAUSEJOUR *et al.*, 1998). Außerdem können die Blutgerinnungsfaktoren Prothrombin (Faktor II), Stuart-Faktor (Faktor X) und Hageman-Faktor (Faktor XII) von Sap-Proteasen aktiviert werden (RÜCHEL, 1983, KAMINISHI *et al.*, 1994). Die aktivierte Kallikrein-Kinin Kaskade erzeugt Bradykinin, das zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität führt (KAMINISHI *et al.*, 1994).

Sap-Proteasen stellen womöglich einen Schutz gegen die zelluläre Immunabwehr des Wirtsorganismus für *C. albicans* dar. Nach der

Phagozytose der *C. albicans*-Zellen von peritonealen Maus-Makrophagen wurde eine starke Produktion von Sap4p-Sap6p demonstriert. Die $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante wurde nach dem Kontakt mit Makrophagen zu 53% effektiver als der Wildtyp-Stamm eliminiert (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1998).

Die Sap-Proteasen sind in der Gattung *Candida* als Genfamilie stark verbreitet. Die bislang klinisch relevanteste Art - *C. albicans* - besitzt zehn SAP-Gene. Die weniger pathogenen, aber in der Klinik oft vorkommenden Arten *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* besitzen jeweils mindestens sieben, vier, und zwei SAP-Gene (DE VIRAGH *et al.*, 1993, GILFILLAN *et al.*, 1998, ZAUGG *et al.*, 2001). In den letzten Jahren wurde die Existenz sekretorischer Aspartat-Proteasen sowohl bei den human- als auch bei den pflanzenpathogenen Ascomyceten *Aspergillus oryzae* (BERKA *et al.*, 1993), *Aspergillus awamori* (BERKA *et al.*, 1990), *Botrytis cinerea* (MOVAHEDI & HEALE, 1990), *Botryotinia fuckeliana* (PRINS *et al.*, 1999, AF121229) und *Glomerella cingolata* (CLARK *et al.*, 1997) gezeigt. Sekretorische Aspartat-Proteasen sind offensichtlich nicht ausschließlich auf dieses Taxon eingeschränkt. Eine Aspartat-Protease-Isoenzymfamilie mit vier Mitgliedern wurde bei dem medizinisch und ökonomisch relevanten Zygomycet *Rhizopus oryzae* detektiert (FARLEY & SULLIVAN, 1998). Die Sekretion von Aspartat-Proteasen scheint evolutionär ein wichtiger konvergenter Faktor zu sein, der für eine Anpassung der Pilze an Habitate mit einem überwiegenden Anteil an Proteinen als Stickstoffquelle wichtig zu sein scheint. Die Verfügbarkeit von Aminosäuren und kleinen Peptiden – einem Abbauprodukt von Proteinen - sollte durch die vermehrte Sekretion der Proteasen gesteigert und damit die Wachstumsvorteile des Pilzes verbessert werden. Die Effizienz der Proteinhydrolyse könnte einerseits durch Genduplikationen andererseits durch eine regulierte Aktivierung von der Protease-Genen erreicht werden.

IV.1.2.2. BESONDERHEITEN DER LETZTEN ZWEI MITGLIEDER SAP9P UND SAP10P DER SAP-ISOENZYMFAMILIE

Die beiden zuletzt identifizierten Mitglieder der Sap-Isoenzymfamilie, Sap9p und Sap10p, unterscheiden sich von den anderen Sap-Proteasen durch einen um jeweils ca. 50 Aminosäuren längeren C-Terminus (III.3., Abb. 33). Auf diesem Abschnitt der Proteine befinden sich die Erkennungssequenzen für eine GPI-Verankerung. In den Positionen ω_0 und ω_{+2} der GPI-Erkennungsdomäne liegen jeweils Glycin (G⁴⁹³) und Serin (S⁴⁹⁵) bei Sap9p bzw. Aspartat (N³⁹⁸) und Serin (S⁴⁰⁰) bei Sap10p, die von einer Transaminase erkannt werden. Sie spaltet solche Proteine zwischen den Positionen ω_0 und ω_{+1} und fügt einen GPI-Anker hinzu, der eine Bindung an die Zellwand bzw. Plasmamembran gewährleistet (GERBER *et al.*, 1992, CARO *et al.*, 1997). Einen zusätzlichen Hinweis auf die Lokalisierung der beiden Proteasen in der Zellwand bzw. Plasmamembran lieferte die Beobachtung, dass bei der Überexpression der kompletten SAP9- und SAP10-Gensequenzen in *P. pastoris* die Proteasen nicht in den Kulturüberstand sezerniert wurden. Erst nach dem Entfernen der GPI-Erkennungsdomäne aus den Klonierungsvektoren konnte eine Sekretion von Sap9p und Sap10p erreicht werden (M. MONOD, persönliche Mitteilung). Die beiden Aspartat-Proteasen Yps1p und Yps2p von *S. cerevisiae* zeigen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Sap9p und Sap10p (III.3.1.). Sie sind beide GPI-Proteine mit den dafür typischen C-terminalen Erkennungssequenzen (GPI-Erkennungsdomäne, gefolgt von einer hydrophilen Serin / Threoninreichen und einer hydrophoben Region (III.3.1., Abb. 33)). Bei den ersten Untersuchungen zur Lokalisation der Yapsine Yps1p und Yps2p konnten beide Proteasen mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) von der Zelloberfläche freigesetzt werden (ASH *et al.*, 1995). Die Lokalisation an der Plasmamembran von Yps1p wurde mittels Immunoblotting mit polyklonalen Yps1p-Antikörper (ASH *et al.*, 1995) und von Yps2p durch Protease-Aktivitätsmessung in der wässrigen Phase (KOMANO & FULLER, 1995) bestimmt. Als nächstes Merkmal für die Lokalisation Yps1p und Yps2p an

der Plasmamembran wurde die C-terminale dibasische KR-Sequenz abwärts von der GPI-Erkennungsdomäne genannt (CARO *et al.*, 1997), die in den Sequenzen von Sap9p und Sap10p nicht vorhanden sind (Abb. 33). In einer anderen Studie wurde mit der Behandlung der *S. cerevisiae*-Zellen mit Glucanasen Quantazyme und Glycanex die Lokalisation von Yps1p in der Zellwand gezeigt (DE SAMPAIO *et al.*, 1999). Gleichzeitig wurde das Modell für ein alternatives „Targeting“ von GPI-Proteinen in Hefe (VOSSEN *et al.*, 1997) und die Integration der Proteine in die Plasmamembran mit der C-terminalen KR-dibasischen Sequenz (CARO *et al.*, 1997) widergelegt. Stattdessen wurde eine ausschließliche Rolle des GPI-Ankers für eine Zellwandverankerung bei Hefen vorgeschlagen (DE SAMPAIO *et al.*, 1999).

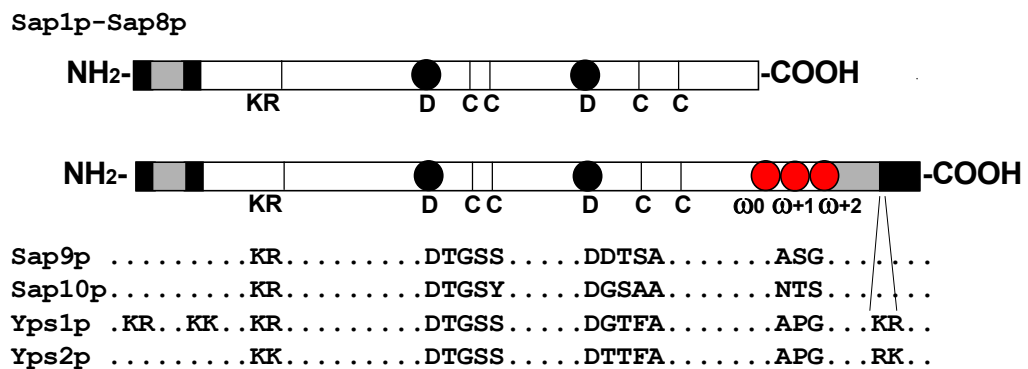


Abb. 33. Schematische Darstellung der sekretorischen Aspartat-Proteasen Sap1p-Sap8p (oben), GPI-Aspartat-Proteasen Sap9p und Sap10p von *C. albicans* und Yps1p und Yps2p von *S. cerevisiae* (unten). Abgebildete strukturelle Elemente: N-terminale Signalsequenz mit flankierenden hydrophoben (schwarze Felder) und mittleren hydrophilen Regionen (graues Feld), Kex2p-Erkennungssequenz (KR), zwei Aspartat-Reste (D, schwarze Punkte) in katalytischen Zentrum, Cystein-Reste (C), C-terminale GPI-Erkennungsdomäne mit Positionen ω_0 , ω_{+1} und ω_{+2} (rote Punkte) gefolgt von einer hydrophilen (graues Feld) und einer hydrophoben Region (schwarzes Feld).

Yps1p und Yps2p sind bei *S. cerevisiae* prozessierende Enzyme, die alternativ zu der Serinprotease Kex2p N-terminale dibasische und / oder monobasische Lysin- / Arginin-Konsensussequenzen erkennen (KOMANO & FULLER, 1995, OLSEN *et al.*, 1998, KOMANO *et al.*, 1999). Tatsächliche Zielproteine der Yapsine sind allerdings bisher nicht identifiziert worden. Bei

C. albicans wurde die Existenz von zu Kex2p alternativen prozessierenden Enzymen von NEWPORT & AGABIAN (1997) postuliert, da Sap2p in der $\Delta kex2$ -Mutante weiterhin von einem anderen Enzym oder autokatalytisch prozessiert wurde. Die Ähnlichkeiten in der Struktur und möglicherweise auch die Lokalisation von Sap9p, Sap10p, Yps1p und Yps2p lassen vermuten, dass diese Proteasen auch eine ähnliche prozessierende Funktion haben könnten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Substratspezifität (III.4.3.) deuten darauf hin, dass Sap9p und Sap10p tatsächlich spezifische Schnittstellen bevorzugen könnten. So wurde Serumalbumin, welches von den meisten Sap-Proteasen gespalten werden kann, von Sap9p und Sap10p auch unter optimalen Bedingungen nur geringfügig hydrolysiert, während Sap2p das Protein nahezu vollständig hydrolysierte (III.4.3.). Das Vorkommen *SAP9*- und *SAP10*-ähnlicher Gene in den Genomen nicht-proteolytischer *Candida*-Arten *C. glabrata* und *C. krusei* unterstützt die Aussage über eine Funktion von Sap9p und Sap10p die über die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *C. albicans* hinaus geht (III.3.3.).

Die beiden Proteasen Sap9p und Sap10p sind die ersten der Sap-Isoenzymfamilie, deren Deletion eine Auswirkung auf die Morphologie von *C. albicans* zeigte (III.3.5.). Sowohl in flüssigem als auch auf festem, hypheninduzierendem FCS-Medium zeigte die $\Delta sap9$ -Mutante einen leichten Defekt in der Myzelausbildung. Sie bildete weniger und zugleich kürzere Hyphen. Dagegen wurde bei der $\Delta sap10$ -Mutante auf FCS-Festmedium im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314 kaum ein Unterschied festgestellt. Im FCS-Flüssigmedium waren die beiden Mutanten in der Myzelausbildung gleichstark eingeschränkt. In dem weniger stark hypheninduzierenden Lee's-Medium wurden kaum phänotypische Unterschiede zwischen den $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet.

Auf YCB / BSA-Medium mit Protein als einzige Stickstoffquelle kann die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *C. albicans* getestet werden, da hier nur proteolytische Varianten wachsen können. Es waren jedoch keine

signifikanten Wachstumsunterschiede bei $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen, woraus zu schließen ist, dass Sap9p und Sap10p einzeln keinen direkten Einfluss auf die extrazelluläre proteolytische Aktivität bei *C. albicans* haben (III.3.5.).

Die verlangsamte vegetative Teilung in der späten logarithmischen- und ein leicht verspäteter Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wurde bei den $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Isogenen beim Wachstum auf YPG-Flüssigmedium bei sauren pH-Werten und niedrigen Temperaturen besonders deutlich (III.3.5.). Ein ähnliches Phänotyp wurde bei den $\Delta kex2$ -Mutanten von *S. cerevisiae* und *C. glabrata* beobachtet (OLUWATOSIN & KANE, 1998, BADER *et al.*, 2001) und könnte auf die überschneidenden Funktionen von Sap9p und Sap10p mit Kex2p hindeuten. Gleichzeitig könnten das verlangsamte Wachstum und der leichte Defekt in der Myzelausbildung auf eine Funktion von Sap9p und Sap10p im Zellwandaufbau zurückzuführen sein. Auch das leicht reduzierte Wachstum der beiden $\Delta sap9$ - und $\Delta sap10$ -Mutanten auf hyperosmotischen Medien (III.3.5.) kann auf einen Beitrag beider Proteasen im Zellwandaufbau hindeuten. Die geringen phänotypischen Unterschiede der Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtypstamm SC5314 beim Wachstum auf hyperosmotischen Medien könnte auf überlappende Funktionen von Sap9p und Sap10p zurückführen. In dem Fall sollte die Deletion beider Gene einen deutlicheren Phänotyp zeigen. So ergab auch das Ausschalten eines einzelnen *YPS1*- oder *YPS2*-Gens in *S. cerevisiae* keine phänotypische Auswirkung. Erst die Deletion beider Gene verursachte ein vermindertes Wachstum bei 37°C (KOMANO & FULLER, 1995). Offensichtlich haben die beiden GPI-Proteasen in *C. albicans* eine wichtige Rolle, da sich die Deletion einzelner Gene auf die Myzelausbildung, das generelle Wachstum und die Zellwandintegrität auswirkte (III.3.4., III.3.5.) und sollte die Virulenz des Pilzes beeinflussen. Die GPI-Proteasen Sap9p und Sap10p könnten möglicherweise der Umgestaltung der Zelloberfläche bei sich verändernden Umweltbedingungen und damit zu der Anpassungsfähigkeit des Pilzes beitragen.

IV.1.3. *IN VITRO* EXPRESSIONSPROFIL DER *SAP*-GENE

IV.1.3.1. EXPRESSION VON *SAP1-SAP8* *IN VITRO*

Untersuchungen der *SAP*-Transkripte mittels RT-PCR im Wildtypstamm SC5314 von *C. albicans* haben gezeigt, dass die *SAP*-Expression (III.1.1.) sowie die Sap-Sekretion (REMOLD *et al.*, 1968) in proteinhaltigem Medium stark angeregt wird (Tab. 13). Im Vergleich zu den anderen getesteten Medien waren alle untersuchten *SAP*-Gene außer *SAP8* im YCB / BSA-Medium stark exprimiert (III.1.1.1.2). Die Expression von *SAP8* wurde hauptsächlich in der logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C nachgewiesen (HUBE *et al.*, 1997b, MONOD *et al.*, 1998). Deshalb ist es nicht auszuschließen, dass die Inaktivierung des *SAP8*-Gens auf die Inkubationstemperatur bei 37°C zurückzuführen ist.

In dem gleichen YCB / BSA Medium wurden die „white“ und „opaque“ Form des *C. albicans* Stammes WO-I auf *SAP*-Transkripte bei 37°C und 25°C untersucht (III.1.1.1.4). Dieser Stamm zeigte eine andere Regulation der *SAP*-Expression als der Stamm SC5314 (Tab. 13). In beiden Formen war die Expression von *SAP2* am meisten, von *SAP5* kaum und von *SAP3* erst in der späten logarithmischen Wachstumsphase zu beobachten. Die Expression der *SAP*-Gene, vor allem von *SAP1*, *SAP3*, *SAP6* und *SAP8*, war in der „opaque“ stärker als in der „white“ Form. Diese Aussage stimmt mit den Beobachtungen überein, dass WO-I „opaque“ Zellen einen stärker proteolytischen Phänotyp als „white“ Zellen zeigten (MORROW *et al.*, 1992, 1993). In früheren Studien wurden die *SAP1*, *SAP2* und *SAP3*-Transkripte mittels Northern-Blot-Analyse in der logarithmischen Wachstumsphase der „opaque“ Form und ausschließlich *SAP2*-Transkript in der gleichen Wachstumsphase der „white“ Form nachgewiesen (HUBE *et al.*, 1994, WHITE & AGABIAN, 1995). Mit der sensitiveren Methode der RT-PCR konnte die Expression von *SAP1-3* in beiden Zellformen nachgewiesen werden. Obwohl die meisten *SAP*-Transkripte sowohl in SC5314 als auch in WO-I nachweisbar waren, kann aufgrund der zum Teil unterschiedlichen Expressionsmuster gefolgert werden, dass die Expression nicht nur von dem

Außenprotein aktiviert wird, sondern auch durch andere intrazelluläre Regulationsmechanismen. Beim „Switching“ kann eine Phasen-spezifische Gruppe von Genen, deren Produkte an verschiedenen intrazellulären Prozessen teilnehmen, auf dem Transkriptionsniveau gleichzeitig reguliert werden (SRIKANTHA *et al.*, 1995, SOLL, 1997, SRIKANTHA *et al.*, 2000). Jedoch ist noch unklar, wie dieser Regulationsmechanismus beim „Switching“ funktioniert.

Expressionsuntersuchungen nach dem Umsetzen von *Candida*-Zellen des Stammes SC5314 aus YPG-Vollmedium in Minimalmedium mit Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle (III.1.1.1.3.) haben gezeigt, dass nicht bei allen *SAP*-Genen die Expression in Abwesenheit von Protein im Medium reprimiert wurde (Tab. 13). Vor allem *SAP2*, *SAP3* und *SAP8* wurden fast zu allen getesteten Zeitpunkten exprimiert und nur langsam herunterreguliert. Dagegen wurden *SAP1*, *SAP4* und *SAP5* in der Absenz des Proteins schnell inaktiviert, was auf einen Einfluss des Proteins bzw. der Ammoniumionen im Medium auf die Transkriptionskontrolle dieser Gene hindeutet. Eine schwache Transkriptionsreaktivierung dieser Gene nach 27, 48 und 75 Stunden könnte durch das Absterben von *Candida*-Zellen und das dadurch freiwerdende Zellprotein erklärt werden. CRANDALL & EDWARDS (1987) berichteten, dass die Sap-Produktion beim Wachstum von *C. albicans* in Medium mit Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle nicht stimuliert wurde. Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsuntersuchungen zeigten, dass die *SAP*-Transkriptionsrate zwar gesenkt und auf einem minimalen Niveau gehalten wurde, aber trotzdem die Expression von *SAP*-Genen beim Wachstum im Medium ohne Protein nicht vollständig eingestellt wurde (III.1.1.1.3.). Dabei werden vermutlich Sap-Proteasen in nur geringen Mengen weiterhin ausgeschieden, die im *C. albicans*-Kulturüberstand kaum detektierbar sind. Bei der Detektion von Sap-Proteinen in Proteasen-induzierendem Medium wurden von den acht Proteasen (Sap1p-Sap8p) der Sap-Isoenzymfamilie nur die drei Proteasen Sap2p, Sap3p und Sap8p aus den Kulturüberständen von *C. albicans* isoliert (MORRISON *et al.*, 1993, WHITE

SAP- Gene	SC5314-Stamm				WO-I-Stamm	
	Getestete Medien					
	5% FCS 37°C	Lee's 25°C→37°C	YNB / NH ₄ ⁺ 37°C	YCB / BSA 37°C	YCB / BSA 37°C	YCB / BSA 25°C
SAP1	0	<<<	--	---	--	^^
SAP2	0	---	>	---	--	---
SAP3	0	<<<	>	---	--	---
SAP4	---	<	^	---	>>>	^^
SAP5	^^	<<	^	<	>	>
SAP6	^	--	>	---	>	>>
SAP8	0	<<<	^^	0	0	^^
SAP9	---	---	---	---	<<	---
SAP10	^^	<<<	>	---	^^^	<<<

Tab. 13. Zusammenfassung der Untersuchung des Expressionsprofils mittels RT-PCR von SAP-Genen unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen wie Myzelinduktion in 5% FCS- bzw. Lee's-Medien, Wachstum in Minimalmedium mit Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle (YNB / NH₄⁺) und Wachstum in Proteasen-induzierendem Medium (YCB / BSA) zweier *Candida*-Stämmen SC5314 und WO-I. Abkürzungen in der Tabelle: > -Abschwächung der Expression, < -Verstärkung der Expression, ^ -unregelmäßige Expression, - -konstitutive Expression, 0 -keine Expression. Drei gesetzte Zeichen entsprechen einer starken, zwei einer mittelmäßig starken und eins einer schwachen Expression.

et al., 1993, SMOLENSKI *et al.*, 1997). Der Großteil der proteolytischen Aktivität von *C. albicans* ist auf die Sekretion von Sap2p zurückzuführen (HUBE *et al.*, 1994, WHITE & AGABIAN, 1995). Die anderen Sap-Isoenzyme werden nur in geringen Mengen sezerniert und sind nur schwer nachzuweisen. Deshalb sind diese auch in den meisten proteinchemischen Untersuchungen nicht gefunden worden. Die begrenzte Sekretion von Sap-Proteasen kann auch darauf zurück zu führen sein, dass sie für die Pilzzelle selbst in großen Mengen toxisch sind.

Bei der Analyse der Regulation der SAP-Expression beim Hefe-Myzel-Übergang in myzelinduzierenden 5%igem FCS- und Lee's-Medien (III.1.1.1.1) wurden Expressionsunterschiede zwischen den beiden Medien festgestellt (Tab. 13). Zwar riefen die beiden Medien den gleichen Morphologiewechsel hervor, wirkten sich aber unterschiedlich auf die

Transkriptionsregulation der *SAP*-Gene aus. Im Gegensatz zu Lee's-Medium wurde im Serum-Medium eine Repression von *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* und *SAP8* beobachtet (III.1.1.1.1.). Dies kann darauf hinweisen, dass Serum Komponenten enthält, die einerseits die Myzelbildung des Pilzes aktivieren und andererseits die Expression bestimmter Gene direkt oder indirekt hemmen. Diese Regulation von *SAP1-3* und *SAP8* kann auf der histologischen bzw. chronologischen Spezifität der einzelnen Gene während einer Infektion beruhen. Im RHE-Modell wurden nach 42 Stunden Infektion zunächst Transkripte von *SAP1* und *SAP3*, dann von *SAP6* nach 48 Stunden und von *SAP2* und *SAP8* nach 60 Stunden, nachgewiesen (SCHALLER *et al.*, 1998). In klinischen Proben eines Patienten mit einer akuten oralen Kandidose und eines HIV-positiven Patienten mit einer chronischen Kandidose wurde ebenfalls die Expression von jeweils *SAP1*, *SAP3* und *SAP6* oder *SAP1-3*, und *SAP6* detektiert (SCHALLER *et al.*, 1998). Die Inaktivierung von *SAP1-3* und *SAP8* in Serum schränkt den Einsatz dieser Proteasen auf die oberflächlichen epithelialen Infektionen ein. Die Untersuchung der Regulation der Expression beim Hefe-Myzel-Übergang wurde vor allem auf die myzelspezifische Subfamilie *SAP4-6* (HUBE *et al.*, 1994, WHITE & AGABIAN, 1995) fokussiert (III.1.1.2., III.1.3.). Da diese drei Proteasen eine sehr hohe Homologie zueinander zeigen, wurden bei den ersten Expressionsuntersuchungen im Northern-Blot universale Sonden, wie ein *SAP5*-Fragment (HUBE *et al.*, 1994) bzw. *SAP4-6*-spezifische Oligonucleotide (WHITE & AGABIAN, 1995) zum gleichzeitigen Nachweis aller drei Gene verwendet, die keine Aussage über die Regulation innerhalb dieser Subfamilie ergaben. Mittels RT-PCR konnte das Expressionsverhalten von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* einzeln charakterisiert werden. Dabei wurde festgestellt, dass vor allem die Expression von *SAP4* und von *SAP6* in den beiden getesteten Medien gegenläufig war (III.1.1.1.1.). Während in 5%igem FCS-Medium *SAP4*-Transkripte durchgehend stark und *SAP6*-Transkripte erst zu späteren Zeitpunkten nachweisbar waren, konnten im Lee's-Medium umgekehrt die *SAP6*-Transkripte stark konstitutiv und *SAP4*-Transkripte erst später nachgewiesen werden. Untersuchungen zu einer möglichen Myzelgekoppelten Expression von *SAP4-6* bei Mutanten, denen die

Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p fehlen, welche die Myzelbildung regulieren (LO *et al.*, 1997, SONNEBORN *et al.*, 1999a), unterstützen die Aussage, dass sich der Morphologiewechsel unterschiedlich auf die Expression von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* auswirkt. Das Ausschalten beider Transkriptionsfaktoren verstärkte die Expression von *SAP4* im Lee's-Medium und hemmte die Expression von *SAP5* und *SAP6* im FCS-Medium (III.1.1.2.). Die jüngsten Untersuchungen der Morphologie-Regulation bei *C. albicans* haben gezeigt, dass die Myzelausbildung von mehreren Umweltfaktoren und über mehrere Signaltransduktionswege ausgelöst werden kann (ERNST, 2000). Die Bestimmung des prozentualen Anteils an Myzelzellen zu untersuchten Zeitpunkten in beiden Medien hat gezeigt, dass 5%iger FCS ein stärkerer Auslöser der Myzelbildung bei *C. albicans* als Lee's-Medium fungiert (III.1.1.1.1.). Auch die Inhibition der Transkription von *SAP5* und *SAP6* in der myzeldefizienten Doppelmutante $\Delta efg1 / \Delta cph1$ war in Serum-Medium viel stärker ausgeprägt (III.1.1.2.). Eine Verzehnfachung der Expression von *SAP4-6* wurde in einer Mutante mit einem deletierten *CPP1*-Suppressorgen des Myzelwachstums beobachtet. Unter vergleichbaren Bedingungen wurde in der $\Delta efg1$ -Mutante keine Transkription von *SAP4-6* beobachtet (SCHRÖPPEL *et al.*, 2000). Da in der Studie eine universale Sonde für die Gene *SAP4-6* benutzt wurde, kann über die Regulation von der einzelnen Gene keine Aussage getroffen werden. Jedoch ist es ein deutlicher Hinweis, dass die *SAP*-Transkription parallel zur Regulation der Morphologie über gleiche oder ähnliche Signalkaskaden reguliert werden können.

IV.1.3.2. EXPRESSION VON *SAP9* UND *SAP10* IN VITRO

Die Expression der Gene für die GPI-Aspartat-Proteasen Sap9p und Sap10p wurde wie die der anderen *SAP*-Genen beim Wachstum unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen untersucht (III.1.1., Tab. 13). Dabei wurde festgestellt, dass *SAP9* und *SAP10* ein unterschiedliches Expressionsmuster haben. Unter allen untersuchten Bedingungen war *SAP9* gleichmäßig stark im *C. albicans*-Stamm SC5314 exprimiert (III.1.1.1.1., III.1.1.1.2., III.1.1.1.3., III.1.1.1.4.). Dagegen war *SAP10* unterschiedlich stark in Abhängigkeit vom

untersuchten Medium exprimiert. Einen besonders deutlichen Einfluss auf die Expression von *SAP10* übte Protein als einzige Stickstoffquelle im Wachstumsmedium aus (III.1.1.1.2.). Ausschließlich im Proteinmedium wurde eine gleichmäßig starke Expression dieses Gens beobachtet und nach dem Umsetzen von *C. albicans*-Zellen in Minimalmedium mit Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle wurde die Transkription schnell auf ein stark reduziertes Niveau herunterreguliert (III.1.1.1.3.).

In dem „Switching“-Stamm WO-I unterscheidet sich die Expression von *SAP9* und *SAP10* in den „opaque“ und „white“ Zelltypen beim Wachstum im Proteinmedium YCB / BSA (III.1.1.1.4.). Dabei wurde in der „white“ Form die Expression von *SAP9* erst in der stationären Wachstumsphase und von *SAP10* schon in der logarithmischen Wachstumsphase nachgewiesen. In der „opaque“ Form wurden die beiden Proteasen gleichmäßig und stark zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert. Die Lokalisation von Sap9p- und Sap10p-GPI-Proteasen wird in der Zellwand bzw. Plasmamembran vermutet, wo sie möglicherweise die Zellwandproteine prozessieren, die auch zu Hydrophobizität und Adhärenz von *C. albicans* beitragen können (III.3.1., IV.1.2.2.). Aufgrund der Beobachtung, dass bei 23°C eine homogene hydrophobe Zellpopulation und bei 37°C eine homogene hydrophile Zellpopulation entwickelt wird (HAZEN & HAZEN, 1988), könnte die bei 25°C erzeugte „opaque“ Zellform mit einer konstanten Expression von Sap9p- und Sap10p-GPI-Proteasen eine hydrophobe Zelloberfläche bilden. Hydrophobe Zelloberflächen korrelieren im Vergleich zur hydrophilen mit höherer Adhärenz und Virulenz (ANTLEY & HAZEN, 1988, GLEE *et al.*, 1995). Eine effektive Inhibition der *C. albicans*-Adhärenz zu Keratinozyten ist mit dem Protease-Inhibitor Pepstatin A möglich (OLLERT *et al.*, 1993). Eine Inhibition der *C. albicans*-Adhärenz zu Epithelzellen wurde auch durch die HIV-Aspartat-Protease Inhibitoren Ritonavir[®] und Saquinavir[®] erreicht (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1999). Diese beiden Inhibitoren inhibieren *in vitro* die aufgereinigten HIV-Aspartat-Proteasen, die den Sap-Proteasen von *C. albicans* ähneln (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 1999). Durch diese Protease-Inhibitoren wurden wahrscheinlich nicht nur die sezernierten, sondern auch

die an die Zellwand bzw. Plasmamembran gebundenen Proteasen Sap9p und Sap10p inhibiert. Dies könnte auf eine Modifikation von Hydrophobizität- und Adhärenz-relevanten Oberflächenproteinen hingewirkt haben.

IV.1.4. EXPRESSION VON *SAP*-GENEN *IN VIVO* UND DEREN BEDEUTUNG BEI *CANDIDA*-INFEKTIONEN

IV.1.4.1. NACHWEISMETHODEN DER GENEXPRESSION

Die Analyse der *in vivo* Transkription der *SAP*-Gene spiegelt die Spezifität einzelner virulenzrelevanter Gene bei der Interaktion zwischen Wirtsorganismus und dem Pathogen *C. albicans* wider. Einer der schwierigsten Nachweise für Transkripte ist der im Model einer systemischen Mykose, da die befallenen Organe nur eine geringe Anzahl an Keimen für die Expressionsanalyse enthalten, aber gleichzeitig der starke Hintergrund der Wirtstranskripte ein großes Problem darstellt. Die publizierte „*in vivo* expression technologies“ (IVET) Technik umgeht diese Schwierigkeiten (STAIB *et al.*, 2000). Sie basiert auf einer transient induzierten Expression einer Rekombinase, die durch eine gezielte Rekombination eine Resistenz gegenüber ein Toxin auslöst. Hierzu wurde eine vom *FLP*-Gen kodierte spezifische Rekombinase jeweils hinter den zu untersuchenden genspezifischen Promotor kloniert. Im Falle einer Aktivierung des Promotors wurde ein Markergen für die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (*IMP3*) durch die jetzt translatierte Rekombinase über flankierende Erkennungssequenzen deletiert und damit eine Resistenz gegen Mycophenolsäure erzeugt. Das IVET-System zeigte sich allerdings nicht als sensitiv genug, um auch geringe Genaktivierungen feststellen zu können (STAIB *et al.*, 2000). Zudem kann mit der IVET-Technik keine temporale Genregulation untersucht werden, weil die genspezifische Aktivierung des Promotors zu einer irreversiblen Deletion des Markergens führt. Deshalb kann eine spätere Inaktivierung des Gens mit dieser Technik nicht gezeigt werden. Dagegen werden beim in dieser Arbeit verwendeten direkten Nachweis der Transkripte in einem infizierten Organ mittels RT-PCR die genomischen Manipulationen vermieden, die für die Expressionsanalyse, wie

bei IVET ausschlaggebend sein können. Es wird außerdem eine hohe Sensitivität im Vergleich zum Northern-Blot erreicht. Allerdings beherbergt der Nachweis mit RT-PCR auch einige Probleme. Dadurch, dass *C. albicans*-Keime nach einer Infektion ungleichmäßig in den inneren Organen verteilt sind, war eine genaue Bestimmung der cfu pro Organ und dementsprechend die Quantifizierung der Transkriptmengen ein kritischer Punkt. Die ermittelten Keimzahlen stimmten nicht immer mit der nachgewiesenen Signalstärke für das Haushaltsgen *EFB1* in der Kontroll RT-PCR überein. Deshalb wurde eine Standardmenge der Gesamt-RNA aus infizierten Organen für die cDNA-Synthese und nicht die Keimzahl als Richtlinie für den Transkripten-Nachweis festgelegt. Die einzelnen Zellpopulationen von *C. albicans* erfahren in einem infizierten Organ unterschiedlichen Situationen, weil sie im Organ zerstreut sind und sich in unterschiedlichen Mikronischen des Organs befinden. Deshalb entspricht das nachgewiesene Expressionsmuster der Mehrheit der untersuchten Zellen.

IV.1.4.2. EXPRESSIONSPROFIL VON *SAP1-SAP8* IN VIVO

Der Pilz sollte die Expression seines Sets an Proteasen ständig an die wechselnden Bedingungen bei der Kolonisierung der Wirtsoberflächen bzw. der Gewebeinvasion anpassen. Die gewebespezifischen Expressionseigenschaften der *SAP*-Gene wurden in mehreren Infektionsmodellen in verschiedenen Studien auszugsweise untersucht (Tab. 14). Im Modell der Vaginalkandidose in Ratten wurde die Expression von *SAP1*, *SAP2* und *SAP3* nachgewiesen. Im sauren Milieu des vaginalen Traktes konnten hingegen keine Transkripte für *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* detektiert werden (DE BERNARDIS *et al.*, 1995, 2001).

Bei Patienten mit oraler Kandidose wurde sowohl bei tatsächlich Erkrankten als auch bei den symptomlosen *C. albicans* Trägern eine Grundexpression von *SAP2* und *SAP4-6* festgestellt, wobei die *SAP4*, *SAP5* oder *SAP6* mRNA bei allen Personen detektiert wurde (NAGLIK *et al.*, 1999).

Infektion	Technik	Infiziertes Organ	Getestete SAP-Gene	SAP-Expressionsmuster										Publikation
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
i. p. Maus-Model	RT-PCR	Leber, 4h	SAP1-10	+	+	±	+	+	+	-	+	+	±	Vorliegende Arbeit
		8h		±	+	±	+	+	+	-	±	±	±	
24h	±	+	±	+	+	+	-	+	+	±				
72h	+	+	-	+	+	+	-	+	+	±				
Niere, 72h	±	+	-	+	±	+	-	±	+	±				
	IVET	Leber, 30 min	SAP1-6	-	-	-	-	+	-	X	X	X	X	STAIB <i>et al.</i> , 2000
		4h ^a		-	-	-	-	+	-	X	X	X	X	
4h ^b	-	+	-	-	+	+	X	X	X	X				
Niere, 48h	-	±	-	-	+	±	X	X	X	X				
i. v. Maus-Model	IVET	Niere, 4d ^c Niere, 4d ^d	SAP1-6	-	+	±	±	+	±	X	X	X	X	STAIB <i>et al.</i> , 2000
Oral Maus-Model	RT-PCR	Oesophagus	SAP1-10	-	±	±	+	±	+	-	±	+	-	Vorliegende Arbeit
	RT-PCR	Balb/c, 4d DBA/2, 4d		±	+	±	+	+	+	-	+	+	±	
	IVET	Oesophagus	SAP1-6	-	-	-	-	+	+	X	X	X	X	STAIB <i>et al.</i> , 2000
Oral Patienten-Proben	RT-PCR	Mundhöhle	SAP1-8	-	±	-	+			±	-	X	X	NAGLIK <i>et al.</i> , 1999
				HIV-negativer Patient	-	+	±	+			±	X	X	
	RT-PCR	Mundhöhle	SAP1-7	±	+	±	+			±	X	X	X	NAGLIK <i>et al.</i> , 1999
				HIV-positiver Patient	+	+	+	-	-	+	X	-	X	
	RT-PCR	Mundhöhle	SAP1-6, SAP8	+	-	+	-	-	+	X	-	X	X	SCHALLER <i>et al.</i> , 1998
				HIV-positiver Patient	+	+	+	-	-	+	X	-	X	
Vaginitis-Model der Ratten	RT-PCR	Vaginaler Trakt	SAP1-6	+	+	+	-	-	-	X	X	X	X	DE BERNARDIS <i>et al.</i> , 1995, 2001

Tab. 14. Expression der SAP-Gene *in vivo*.

^a untersuchte an das Organ adhärenzte *C. albicans*-Zellen (STAIB *et al.*, 2000), ^b in das Organ invadierende *C. albicans*-Zellen (STAIB *et al.*, 2000), ^c mit 4×10^5 und ^d 2×10^5 *C. albicans*-Zellen infizierte Mäuse (STAIB *et al.*, 2000). In allen untersuchten Organen nachgewiesene Transkripte wurden mit „+“, nur in einigen Organen nachgewiesene Transkripte wurden mit „±“, keine nachgewiesene Transkripte wurden mit „-“ bezeichnet. Nicht untersuchte Genexpression wurde mit „X“ gekennzeichnet.

Bei der Analyse der SAP-Expression während oraler Infektionen in zwei Mäusestämmen wurde eine stärkere Aktivierung der SAP-Transkription in für

den Komplementfaktor fünf (C5) defizienten DBA/2-Mäusen im Vergleich mit Balb/c-Mäusen gefunden (III.1.2.1.). Die C5-Defizienz erhöht die Empfindlichkeit zur Infektionen (HECTOR *et al.*, 1982, 1990), da C5 für eine Verstärkte Opsonierung und Phagozytose von Pathogenen verantwortlich ist (MILLER & NILSSON, 1974). Sowohl Niveau als auch Repertoire der Expression an SAP-Genen hängen offensichtlich von der Abwehrstärke des Wirtsorganismus ab. In infizierten DBA/2-Mäusen proliferierten *Candida*-Zellen stärker als in den Balb/c-Mäusen. Die vier bis siebenfach höhere Proliferationsrate (III.1.2.1.) korrelierte mit einer starken Expression der Gene *SAP2* und *SAP8* und einer leichten Expression von *SAP1* und *SAP3*. Die Transkripte von *SAP2* und *SAP8* wurden *in vitro* am meisten in der logarithmischen Wachstumsphase beim Wachstum von *C. albicans* im Proteinmedium detektiert und die Transkripte *SAP1*- und *SAP3* wurden ausschließlich bei Patienten mit oraler Kandidose nicht jedoch bei *Candida* Trägern nachgewiesen (NAGLIK *et al.*, 1999). Diese beiden Gene sind also offensichtlich mit einer Infektion assoziiert. In isoliertem Cardia-Gewebe war die Präsenz von *SAP1*- und *SAP2*-Transkripten noch deutlicher (III.1.2.1.). Hier findet bei einer Infektion eine Invasion von *C. albicans* im Grenzbereich zwischen dem verhornten mehrschichtigen Plattenepithel und dem mukösen mehrschichtigen Zylinderepithel statt. Das Expressionsmuster im sauren Milieu der Cardia, das im Antrum einen pH-Wert von 1 bis 2 erreicht (M. Kretschmar, persönliche Mitteilung), entsprach, mit der Ausnahme von *SAP7*, dem Expressionsmuster im RHE-Modell, welches eine mehrschichtige Schleimhaut bei einem neutralen pH-Wert darstellt. In beiden Modellen war die *SAP2*-Transkription auffallend stark, die mit der Rolle der Sap2p-Protease bei der Degradation des Mucins, eines Schutzmantels der Epithelzellen, übereinstimmen könnte (DE REPENTIGNY *et al.*, 2000).

Das Grundmuster von *SAP2* und *SAP4-6* wurde bei der Analyse der Expressionsdynamik der SAP-Gene während einer i. p. Infektion einer Maus untersucht. Vor allem die Expression von *SAP4-6* scheint hier eine ausschlaggebende Rolle zu spielen. Gleichzeitig zur Expressionsanalyse wurde auch die Organschädigung mittels einer Messung der Konzentration

der leberspezifischen Alaninaminotransferase und der pankreasspezifischen α -Amylase, die aus den Wirtszellen bei der Penetration von *C. albicans* freigesetzt wurden, quantifiziert. In diesem Modell war eine $\Delta sap4/5/6$ -Dreifachmutante in ihrer Virulenz stark abgeschwächt. Dagegen zeigten die Mutanten mit einzeln deletierten *SAP1*, *SAP2* und *SAP3* keinerlei Unterschiede zum Wildtypstamm SC5314 (KRETSCHMAR *et al.*, 1999, vorliegende Arbeit). KRETSCHMAR *et al.* (1999) demonstrierten, dass sich sowohl die Hyphenbildung als auch die proteolytische Aktivität auf die Virulenz von *C. albicans* gleichermaßen auswirken können. Es ist daher möglich, dass die Gene *SAP4-6* und die des Morphologiewechsels über eine gemeinsame Signalkaskade reguliert werden. Die in der Myzelbildung defekte und im Mausinfektionsmodell avirulente $\Delta efg1/\Delta cph1$ -Doppelmutante (LO *et al.*, 1997) zeigte im Lee's- und besonders stark im Serum-Medium ein herabgesetztes Transkriptionsniveau von *SAP5* und *SAP6*. Damit kann der Verlust der Virulenz nicht allein durch die defekte Myzelentwicklung erklärt werden, sondern könnte auch auf die verminderte Sekretion virulenzrelevanter Proteasen zurückzuführen sein. Die morphologieassoziierte Inhibition der Genexpression der *SAP4-6* Subfamilie in den $\Delta efg1$ -, $\Delta cph1$ -Einzelmutanten und der $\Delta efg1/\Delta cph1$ -Doppelmutante war bei der i. p. Infektion des Mausmodells weniger ausgeprägt, als *in vitro*. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Myzelentwicklung von Natur, Anzahl und Intensität von Umweltsignalen und der Aktivität der Signalkaskade (ERNST, 2000) abhängig ist, sondern eben auch, zumindest teilweise, die Expression einiger Mitglieder der *SAP*-Genfamilie. Sie könnten zum Teil über die gleichen Signalkaskaden wie der Morphologiewechsel reguliert werden. Neben den Signaltransduktionswegen mit den endständigen Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p existieren offensichtlich weitere Signaltransduktionswege (BROWN & GOW, 1999), die beim Ausfall der Signalübertragung der beiden genannten Signalkaskaden in der $\Delta efg1/\Delta cph1$ -Doppelmutante die *SAP*-Gene regulieren. Eine unterschiedlich starke Auswirkung der Einzeldelationen dieser Transkriptionsfaktoren auf das Expressionsverhalten von *SAP5* und *SAP6* in Lee's und 5%igen FCS-Medien unterstützt die Vermutung über die Existenz

weiterer Signaltransduktionswege und die Regulation der *SAP*-Expression über mehrere Signalkaskaden (Abb. 34). Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p beschränkt sich nicht nur auf die *SAP4-6*-Subfamilie, die als myzelspezifisch gelten (HUBE *et al.*, 1994), sondern betrifft auch die Expression von *SAP1*, *SAP3* und *SAP8*. In der $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Doppelmutante werden alle drei Gene im Vergleich zu den

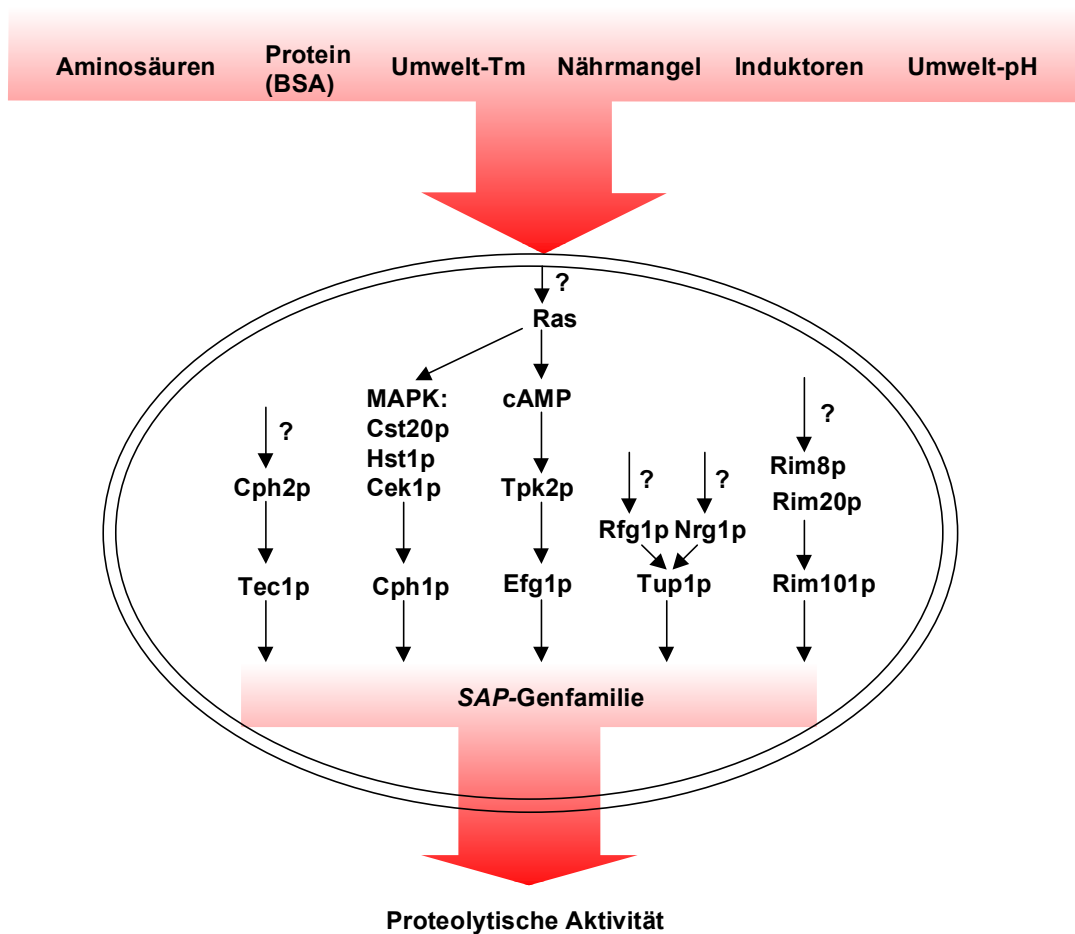


Abb. 34. Zahlreiche Umweltfaktoren werden von der Zelle registriert.

Die von den Oberflächenrezeptoren der Zelle registrierten Umweltveränderungen werden über bestimmte Signaltransduktionswege weiter geleitet. Die entstehenden Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression der Gene, die eine Anpassung an die sich veränderten Bedingungen gewährleisten können. Eines der so regulierten Elemente stellen die Sap-Proteasen dar. Regulation der proteolytischen Aktivität von *C. albicans* findet wahrscheinlich über Transkriptionsfaktoren statt, die in der Regulation anderer wichtiger Ereignisse wie beispielsweise dem Morphologiewechsel teilnehmen.

Einzelmutanten und dem Wildtypstamm hochreguliert und entweder in der $\Delta cph1$ - oder in der $\Delta efg1$ -Einzelmutante inaktiviert. Eine duale Funktion von Efg1p als Aktivator und Repressor ist in der Morphogenese von *C. albicans* bekannt (STOLDT *et al.*, 1997, LO *et al.*, 1997, SONNEBORN *et al.*, 1999a, b, SRIKANTHA *et al.*, 2000). Die Repression von *SAP8* in der $\Delta efg1$ -Mutante sowie von *SAP1* und *SAP3* in der $\Delta cph1$ -Mutante könnte auf eine direkte oder indirekte Einwirkung durch jeweils Cph1p oder Efg1p hindeuten.

Das *C. albicans*-Genomprojekt (<http://www.stanford.edu/group/candida>) unterstützt eine intensive Forschung der Signaltransduktion dieses Pilzes. Es gibt bereits Hinweise, dass die *SAP*-Proteasen, vor allem *SAP4-6*, von den Transkriptionsfaktoren Nrg1p (MURAD *et al.*, 2001b), Tup1p (MURAD *et al.*, 2001a), Cph2p (LANE *et al.*, 2001), Tec1p (SCHWEIZER *et al.*, 2000), und Cpp1p (SCHRÖPPEL *et al.*, 2000, LANE *et al.*, 2001) reguliert werden können, jedoch ist die genaue Lokalisation dieser Faktoren und Regulationseigenschaften in den Signaltransduktionskaskaden noch nicht genau geklärt (Abb. 34).

Das Vorhandensein möglicher Bindungsstellen einiger Transkriptionsfaktoren wie Efg1p, Cph1p, Tec1p, Nrg1p und Rim101p (DAVIS *et al.*, 2000) innerhalb der 1000 bp der *SAP*-Promotorsequenzen zeigt, dass die *SAP*-Gene von den gleichen Transkriptionsfaktoren, die die Morphologie von *C. albicans* kontrollieren, reguliert werden könnten (Tab. 15). Die meisten potentiellen Bindungsstellen der untersuchten Transkriptionsfaktoren wurden in den Promotorregionen von *SAP4-6*, *SAP7* und *SAP8* identifiziert. Auffallend sind die Bindungsstellen für Efg1p und Tec1p, die in der *SAP4-6*-Subfamilie teilweise konserviert sind. Dies könnte auf eine synchrone und gleich starke Regulation der Transkription dieser Gene zumindest von den Transkriptionsfaktoren Efg1p und Tec1p hindeuten.

Neben den Morphologie-spezifischen Genen von *C. albicans* gibt es auch pH-regulierte Gene, wie z. B. die Glucanasen *PHR1* und *PHR2*, die

entsprechend im alkalischen oder saurem Milieu aktiviert werden (MÜHLSCHLEGEL & FONZI, 1997, DE BERNARDIS *et al.*, 1998). Die Regulation

SAP-Promotoren	Transkriptionsfaktoren und Erkennungsmotiv				
	Efg1p 5'-CANNTG-3'	Cph1p 5'-TGAAACA-3'	Tec1p 5'-CATTCTY-3'	Nrg1p 5'-CCCCT-3'	Rim101p 5'-GCCAAG-3'
SAP1P	CAAATG (-137-132)			(-169-165)	
SAP2P	CATTTG (-292-287) CAAATG (-977-972)			(-966-962)	
SAP3P	CATGTG (-492-487) CATGTG (-892-887)				
SAP4P	CAAATG (-119-114) CAAATG (-195-190) CACCTG (-975-970)	(-690-684) (-772-766)	CATTCC (-44-39) CATTCC (-65-60) CATTCC (-804-799)	(-465-461) (-932-928)	
SAP5P	CAAATG (-253-248) CAAATG (-537-532) CAGTTG (-865-860)	(-972-966)	CATTCC (-65-60) CATTCC (-90-85) CATTCC (-115-110)		
SAP6P	CAAATG (-252-247)	(-743-737) (-823-817)	CATTCC (-65-60) CATTCC (-90-85) CATTCC (-115-110) CATTCC (-855-850)	(-529-525) (-983-979)	
SAP7P	CAATTG (-484-479)	(-752-746)		(-681-677) (-695-691)	
SAP8P	CAAATG (-594-589) CACTTG (-829-824)		CATTCT (-181-176)	(-642-638) (-981-977)	(-967-962)
SAP9P	CATCTG (-38-33) CAATTG (-62-57) CAAATG (-215-210) CAATTG (-301-296) CAAATG (-533-528) CAGCTG (-866-861)				
SAP10P	CATTTG (-47-42) CAACTG (-79-74) CACATG (-335-330) CATTTG (-428-423) CAAGTG (-837-832)			(-553-549)	

Tab. 15. Lokalisation der potentiellen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren Efg1p, Cph1p, Tec1p, Nrg1p und Rim101p in den Promotoren der SAP-Gene. Die Promotorsequenzen 1000 bp stromaufwärts vom Start-Codon ATG der SAP1-10 Genen wurden auf Bindungsstellen von Morphologie-regulatorischen Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Lokalisationen der Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind in Klammern angegeben. Die identische Lokalisation der Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren Efg1p und Tec1p in den Promotoren von SAP4-6 sind fett geschrieben.

dieser Gene findet über den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rim101p statt, der im alkalischen pH-Bereich induziert wird (DAVIS *et al.*, 2000). Die Zugehörigkeit von Rim101p zu den MAP- und cAMP-Signaltransduktionswegen mit den endständigen Faktoren Cph1p und Efg1p

ist noch nicht klar (EL BARKANI *et al.*, 2000). Das *SAP8* ist das einzige Gen, das eine Bindungsstelle für Rim101p in seinem Promotor enthält. In den früheren Untersuchungen des Expressionsverhaltens von *SAP8* wurden die meisten Transkripte beim Wachstum bei niedrigerer Temperatur 25°C nachgewiesen und eine temperaturbedingte Regulation des Gens vorgeschlagen (MONOD *et al.*, 1998). Eine besonders deutliche Transkriptionsverstärkung des *SAP8*-Gens wurde im Lee's-Medium nach dem Umsetzen der *Candida*-Zellen aus einem sauren Milieu bei 25°C in ein alkalisches Milieu bei 37°C beobachtet und könnte tatsächlich auf eine Bindungsstelle für Rim101p im Promotor-Bereich des *SAP8*-Gens deuten.

IV.1.4.3. EXPRESSIONSPROFIL VON *SAP9* UND *SAP10* *IN VIVO*

Bei den untersuchten *in vivo* Infektionsmodellen zeigen *SAP9* und *SAP10* ein einheitliches Expressionsmuster. Wie auch bei den *in vitro* Studien konnte die Expression von *SAP9* als gleichmäßig und stark bezeichnet werden. Die Transkripte wurden sowohl bei oralen und i. p. Infektionen einer Maus während allen Infektionsstadien als auch im RHE-Modell nachgewiesen. Die Expression von *SAP10* wurde offensichtlich im Laufe der Infektion reguliert. Die meisten Transkripte wurden zu den mittleren Zeitpunkten 8 und 24 Stunden nach Initiation der i. p. Infektion nachgewiesen. Sie waren in keinem der infizierten Balb/c-Mäuse im Oesophagus und auch nicht im RHE-Modell nach 36 Stunden Infektion nachweisbar. Dagegen konnte *SAP10*-Expression in den meisten infizierten Tieren im Oesophagus der *Candida*-empfindlicheren DBA/2-Mäuse gezeigt werden. Die Expression von *SAP9* und *SAP10* wurde von der Deletion der Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p in den $\Delta cph1$ -, $\Delta efg1$ -Einzelmutanten sowie in der $\Delta efg1 / \Delta cph1$ -Doppelmutante nicht deutlich beeinflusst, obwohl in den Promotoren beider Gene jeweils sechs und fünf potentielle Efg1p-Bindungssequenzen vorhanden sind (Tab. 15). Es ist nicht ausgeschlossen, dass *SAP9* und *SAP10*-Expression viel mehr von anderen noch unbekanntem Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

IV.2. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die zahlreichen Untersuchungen über die Expression der SAPs und zur Auswirkung der Deletion einzelner SAP-Gene haben gezeigt, dass die Sap-Proteasen sehr differenziert von *C. albicans* eingesetzt werden (Tab. 16). Die Isoenzymfamilie Sap1p-Sap3p ist bedeutend für die Schleimhaut-Infektionen der Mundhöhle und des vaginalen Traktes (DE BERNARDIS *et al.*, 1999, NAGLIK *et al.*, 1999, SCHALLER *et al.*, 1999, DE REPENTIGNY *et al.*, 2000). Eine Aktivität der Myzel-spezifischen Isoenzymfamilie Sap4p-Sap6p wurde vor allem bei disseminierenden *Candida*-Infektionen festgestellt und war bei systemischen Mykosen von besonderer Bedeutung (SANGLARD *et al.*, 1997, KRETSCHMAR *et al.*, 1999, SCHALLER *et al.*, 1999, STAIB *et al.*, 2000, vorliegende Arbeit). Die Expression von SAP7 konnte nur bei den oralen (NAGLIK *et al.*, 1999) und nie bei den systemischen Infektionen (vorliegende Arbeit) nachgewiesen werden. Die Funktion dieses Gens bleibt unklar. Die Sap8p-Protease scheint sowohl bei den oberflächlichen Schleimhautinfektionen als auch bei den systemischen Mykosen wichtig zu sein. Die beiden GPI-Proteasen Sap9p und Sap10p haben wahrscheinlich eine prozessierende Funktion an der Zelloberfläche. Jedoch wurde die genaue Lokalisation der beiden Proteasen experimentell noch nicht gezeigt. Der leichte Defekt in der Myzelausbildung und beim Wachstum könnte sich bei der Deletion beider Gene verstärken. Da sich die Funktionen dieser Gene möglicherweise überschneiden, könnte die Herstellung einer $\Delta sap9/10$ -Doppelmutante einen deutlicheren Phänotyp zur Geltung bringen. Das Ausschalten beider Gene könnte sich möglicherweise auf die Oberflächeneigenschaften des Pilzes wie Adhärenz und Hydrophobizität auswirken. Von großem Interesse ist die Auswirkung der Mutationen in SAP9- und SAP10-Genen auf die Virulenz von *C. albicans*, die in einem Maus-Model getestet werden kann. Ein wichtiges Untersuchungsgebiet ist die genaue Bestimmung von Zielproteinen der beiden Proteasen, was durch die Auftrennung der isolierten *Candida*-Zellwandproteine in 2D-Proteingelen erreicht werden kann.

In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Expression einzelner *SAP*-Gene von unterschiedlichen Faktoren reguliert werden. Die Regulation der *SAP*-Transkription ist noch wenig erforscht. Sie werden mit hoher Wahrscheinlichkeit zusammen mit anderen Genen von mehreren Faktoren

Subfamilie	Wichtig für die folgenden Infektionen	Publikationen
Sap1p-Sap3p	- Haut- / Schleimhaut-Infektionen - Vaginale Infektionen	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 NAGLIK <i>et al.</i> , 1999 DE REPENTIGNY <i>et al.</i> , 2000 Vorliegende Arbeit DE BERNARDIS <i>et al.</i> , 1999
Sap4p-Sap6p	- Systemische Mykosen - Haut- / Schleimhaut-Infektionen - Oesophagus-Infektionen - Kolonisation der Oberflächen	SANGLARD <i>et al.</i> , 1997 KRETSCHMAR <i>et al.</i> , 1999 STAIB <i>et al.</i> , 2000 Vorliegende Arbeit SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 STAIB <i>et al.</i> , 2000 Vorliegende Arbeit NAGLIK <i>et al.</i> , 1999
Sap7p	- Orale Infektionen	NAGLIK <i>et al.</i> , 1999
Sap8p	- Haut- / Schleimhaut-Infektionen - Systemische Mykosen	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 Vorliegende Arbeit
Sap9p-Sap10p	- Prozessierende Enzyme der Oberflächenproteinen	Vorliegende Arbeit

Tab. 16. Bedeutung der Sap-Isoenzymsubfamilien bei *C. albicans*-Infektionen.

mitreguliert (Abb. 34). Deshalb stellt die Untersuchung der regulatorischen Elemente der *SAP*-Gene, die über die Transkriptionsfaktoren verschiedener Signalkaskaden reguliert werden können, ein interessantes Forschungsgebiet dar. Vor allem ist die Identifizierung von Signalrezeptormolekülen auf der Zelloberfläche, die die Initiation einer Signaltransduktion gewährleisten, wichtig für das Verständnis der Regulation der *SAP*-Genen, die am Ende der Signaltransduktionskaskade stehen.