

I. Einleitung

I.1. Die historische Entdeckung und Beschreibung humanpathogener Pilze der Gattung *Candida*

Die erste Beschreibung einer oralen *Candida* Infektion erfolgte bereits im vierten Jahrhundert v. Chr. durch Hippokrates (Calderone, 2002). Zu jener Zeit wurde, die heute als Soor bezeichnete Erkrankung der oralen Schleimhaut (pseudomembranöse Form) noch ausschließlich auf einen Defekt des Erkrankten zurückgeführt. Die Vorstellung, dass die beobachteten Symptome mit einer möglichen Pilzinfektion in Zusammenhang stehen könnten, war nach dem damaligen Wissensstand noch nicht bekannt. Selbst relativ junge Publikationen zeigen, dass diese Ansicht bis ins 20. Jahrhundert noch weit verbreitet war. So beschrieb Aldo Castellani noch 1920 Soor als krankhafte Sekretion der Mundschleimhaut (Castellani, 1920).

Erste Belege für einen Zusammenhang der beobachteten Symptome mit einer Pilzinfektion lieferten die 1846 veröffentlichten Experimente von Fredrik Berg (Berg, 1846), bei denen er Krankheitsmerkmale aufgrund einer Infektion mit isolierten Pilzen reproduzierbar hervorrufen konnte.

Die Identifizierung und Bezeichnung des für Soor verantwortlichen Pilzes war aufgrund von Verwechslungen und häufig auftretenden Änderungen der Taxonomie verwirrend. Untersuchungen von Charles P. Robin führten 1847 zu der Benennung *Oidium albicans*, wobei zum ersten Mal die Bezeichnung „*albicans*“ auftrat (Robin, 1853). Weiterführende Erkenntnisse innerhalb der Taxonomie führten 1923 zum Vorschlag von Christine M. Berkhout, den Soor – hervorrufenden Pilz mit dem Gattungsnamen *Candida* zu versehen (Berkhout, 1923).

In den letzten Jahrzehnten haben sich in der Grundlagenforschung zahlreiche Daten und Informationen zu pathogenen *Candida* Spezies angesammelt. Viele Studien beschäftigen sich mit den Faktoren, welche für die kommensalen und / oder pathogenen Erscheinungsformen von *Candida* Spezies verantwortlich sind. Einen entscheidenden Einfluss hat dabei auch

die Neu – bzw. Weiterentwicklung der Methodenspektren. Moderne Methoden ermöglichen zum einen eine genaue Bestimmung der verschiedenen *Candida* Spezies, bieten aber auch die Voraussetzungen um den Zusammenhang von genetischen und phänotypischen Unterschieden der einzelnen *Candida* Spezies zur Pathogenität zu entschlüsseln. Ein Schwerpunkt liegt in der Identifizierung von Faktoren, welche für die Pathogenität verantwortlich sind.

I.2. *Candida* Spezies und deren Bedeutung als Pathogen

Zirka 150 *Candida* Spezies (spp.) sind bis zum heutigen Zeitpunkt beschrieben worden. Da ein hoher Anteil dieser Spezies (etwa 65%) zu einem Wachstum bei 37°C nicht befähigt ist und damit ein Überleben auf oder im menschlichen Organismus unmöglich erscheint, werden nur wenige von ihnen als potentiell humanpathogen eingestuft (Schauer and Hanschke, 1999). Zu den 13 bekannten humanpathogenen *Candida* Spezies gehören *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. utilis* und *C. viswanathii*. Sie können durch die Analyse verschiedener Eigenschaften, wie zum Beispiel der Hypheninduktion, welche fast ausschließlich bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* auftritt, voneinander unterschieden werden. Neben einer Reihe von etablierten mikrobiologischen Methoden bietet eine weitere, häufig angewandte Identifizierungsmöglichkeit die Kultivierung auf Chrom (chromogenic) – Agar, bei welcher verschiedene *Candida* Spezies bestimmte Substrate unterschiedlich umsetzen und so spezifische Farbreaktion hervorrufen.

Candida Spezies treten in über 50% der gesunden Bevölkerung als Bestandteil der normalen mikrobiellen Flora auf. Genaue Angaben dazu schwanken zum einen in Abhängigkeit der, innerhalb der jeweiligen Studien untersuchten Körperregionen, sowie in Bezug auf die geographische Lage des Studienortes (Calderone, 2002; Soll, 2002).

Das Immunsystem und Bakterien der natürlichen mikrobiellen Flora sind in der Lage, *Candida* spp. als Kommensale zu kontrollieren. Ist jedoch die Immunabwehr beeinträchtigt oder die Mikroflora geschädigt, kann es zur Ausbildung einer oberflächlichen, in schweren Fällen auch zu systemischen *Candida* Erkrankungen kommen. Aufgrund der hohen Durchseuchungsrate innerhalb der Bevölkerung handelt es sich dabei meist um eine endogene Infektion. Prädisponierende Wirtsfaktoren, die eine *Candida* Infektion begünstigen, können unterschiedlichen Ursprungs sein, dazu zählen physiologische (hohes oder sehr niedriges Alter, Schwangerschaft), hämatologische (AIDS, Leukämie), endokrinologische (Diabetes Mellitus), traumatische (Verletzungen, starke Verbrennungen) oder iatrogene (Chemotherapeutika, Dauerkatheter) Faktoren.

Candida spp. können aus nahezu allen Körperregionen isoliert werden, was die Anpassungsfähigkeit des Pilzes an verschiedene Bedingungen mit extremen Unterschieden im pH Wert oder der Verfügbarkeit von Sauerstoff, verdeutlicht. Sogar die Blut – Hirn – Schranke kann von *Candida* überwunden werden, und unter Umständen zu einer Meningitis führen (Jong *et al.*, 2001). Das Auftreten der verschiedenen *Candida* Spezies variiert in Abhängigkeit vom Infektionsort, wobei es sich jedoch häufig um Mischinfektionen mehrerer *Candida* spp. handelt. Trotz neuerlicher Verschiebungen im Artenspektrum bleibt *C. albicans* bei allen Infektionsformen vorherrschend.

Der Anteil der nicht – *C. albicans* Arten, vor allem von *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* und der erst seit 1995 bekannten Spezies *C. dubliniensis*, ist in den letzten Jahren stetig angestiegen (Borg-von Zepelin *et al.*, 1993; Fidel *et al.*, 1999; Hazen, 1995; Sullivan *et al.*, 1995; Wingard, 1995). Bei einigen dieser Arten wird dies auf eine zunehmende oder natürliche Resistenz gegenüber, oft auch prophylaktisch, eingesetzten Antimykotika zurückgeführt. So hat der häufige Einsatz von Fluconazol bei der Behandlung von oberflächlichen und systemischen *Candida* Infektionen zur Folge, dass die Anzahl der Isolate von *C. glabrata* und *C. krusei* deutlich zugenommen hat. Die bereits hohe natürliche Resistenz von *C. krusei* und

C. glabrata gegenüber Fluconazol kann sich bei *C. glabrata*, wahrscheinlich aufgrund der Haploidie begünstigt, noch weiter ausbilden (Fidel *et al.*, 1999; Rex *et al.*, 2000). Ein weiterer Grund für die Zunahme an nicht – *C. albicans* Isolaten liegt wahrscheinlich auch darin begründet, dass sich die Qualität der Identifizierungsmethoden verbessert hat, wodurch Verwechslungen mit *C. albicans* immer seltener auftreten. Schließlich wird die Zunahme von nicht – *C. albicans* Spezies durch die relative Abnahme von *C. albicans* Isolaten durch medikamentöse Behandlung erklärt.

I.3. Eigenschaften von *Candida albicans*

Taxonomisch wird *C. albicans* zum Stamm der Ascomycota mit der Klasse der Hemiascomyceten, der Ordnung Saccharomycetales und der Familie Candidaceae, mit der Gattung *Candida* zugeordnet.

C. albicans ist an sehr unterschiedliche Habitate angepasst. Der heterotrophe und fakultativ anaerobe Pilz kann auf verschiedenen Kohlenstoff – und Stickstoffverbindungen wachsen. Die *in vitro* Verdopplungsrate beträgt unter optimalen Bedingungen zirka 60 bis 70 Minuten. *C. albicans* ist sowohl auf der Vaginalschleimhaut mit einem pH Wert von etwa 4,5, als auch im Blut oder Gewebe des Wirts mit einem dort vorherrschenden pH Wert von zirka 7,4 zum Wachstum befähigt. *In vitro* Studien zeigten ein gutes Wachstum von *C. albicans* in einem pH Bereich von 2,5 bis 7,5 bei Temperaturen von 20 bis 38°C. Sogar bei extremen Temperaturen von 5°C bis 46°C ist noch ein Wachstum vorhanden (Hubbard *et al.*, 1986; Odds, 1988).

C. albicans ist ein humanpathogener Pilz, welcher als Bestandteil der normalen Mikroflora existiert, sich aber unter bestimmten Bedingungen unkontrolliert vermehren kann (zum Beispiel bei immunsupprimierten Patienten). Dabei kann der Pilz unter, für den Patienten, ungünstigen Umständen auch in tiefere Gewebe vordringen und so systemische Infektionen hervorrufen.

Eine wichtige Rolle nimmt in diesem Zusammenhang die Zellwand ein. Sie gibt der Zelle ihre Form und bietet als permeable Barriere zum einen Schutz vor Angriffen, zum anderen aber auch die Möglichkeit zur Nährstoffaufnahme, unterstützt von, an der Zelloberfläche lokalisierten Transportsystemen. In Bezug auf die Virulenz kommt der Zellwand als erster Berührungspunkt zwischen dem Pilz und dem Wirt oder anderen Bestandteilen der mikrobiellen Flora eine entscheidende Funktion zu.

I.3.1. Aufbau der Zellwand von *Candida albicans*

Die Zellwand stellt eine dynamische Struktur dar, deren Bestandteile in Abhängigkeit der Wachstumsphase, der Nährstoffbedingungen oder der Interaktion mit anderen Organismen variieren.

Hauptsächlich besteht die Zellwand aus den Glucosepolymeren $\beta(1,3)$ - Glukan (40%) und $\beta(1,6)$ - Glukan (20%). Des Weiteren sind Mannoproteine mit 35 bis 40% in der Zellwand enthalten. Diese können an Serin – oder Threoninresten O- glykosiliert sein bzw. an Asparaginresten N- glykosiliert vorliegen. Zu einem quantitativ geringeren Anteil von nur ein bis zwei Prozent erfüllt Chitin als ein weiteres Makromolekül der Zellwand wichtige strukturelle Funktionen (Klis *et al.*, 2001).

Mit Hilfe der Gefrierfixierung und Elektronenmikroskopie wurde ein Model der molekularen Zellwandstruktur vorgeschlagen (Klis *et al.*, 2001; Tokunaga *et al.*, 1986). Das Grundgerüst besteht dabei aus einem Geflecht verzweigter $\beta(1,3)$ - Glukan Moleküle welches über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten wird. Weitere Zellwandbestandteile wie $\beta(1,6)$ - Glukan und Chitin sind mit dem Grundgerüst über die $\beta(1,3)$ - Glukanseitenketten verbunden. Die Zelloberfläche ist mit Mannoproteinen bedeckt, sodass das immunogene Glukangerüst nicht nach außen exponiert wird. Zellwandproteine, wie zum Beispiel die Pir (protein with internal repeats) Proteine sind in direktem Kontakt mit dem $\beta(1,3)$ - Glukannetzwerk. Dagegen sind die Glykosylphosphatidylinositol (GPI)- verankerten Proteine in der

Zellwand vorrangig mit $\beta(1,6)$ - Glukan Molekülen des Grundgerüsts assoziiert. (Klis *et al.*, 2001).

Die Bedeutung und Funktion der verschiedenen Zellwandproteine aufzuklären, ist das Ziel aktueller Untersuchungen. Generell haben diese Proteine aufgrund ihrer Lokalisation einen Einfluss auf die Permeabilität und Hydrophobizität der Zellwand sowie deren Anfälligkeit gegenüber fremden, degradierenden Enzymen (de Nobel *et al.*, 1990; Masuoka and Hazen, 1999). Auch im Zusammenhang mit der Virulenz spielen Zellwandproteine eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Als (agglutinin like sequence) Proteine für die Adhäsion an Säugerzellen mitverantwortlich sind (Hoyer, 2001). Somit können einige der Zellwandproteine zu den Virulenzfaktoren von *C. albicans* gezählt werden.

I.3.2. Virulenzfaktoren von *Candida albicans*

In vielen grundlegenden Eigenschaften ähnelt *C. albicans* der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Ein großes Interesse gilt daher der Untersuchung der genetischen und phänotypischen Unterschiede zwischen *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Es wird erwartet, dass durch den Vergleich wichtige Informationen über die Ursachen der Pathogenität von *C. albicans* erhalten werden können. Die Ausprägung der Virulenz wird jedoch von vielen verschiedenen Attributen beeinflusst. Neben den umwelt- bzw. wirtsspezifischen Faktoren ist eine Vielzahl von Genen des Pilzes für dessen Virulenz von Bedeutung. Man unterscheidet dabei zwischen Genen oder Proteinen, die ausschließlich für die Interaktionen mit dem Wirt benötigt werden (Virulenzfaktoren) und Genen oder Proteinen, die zur Virulenz beitragen, die aber auch für ein normales Wachstum in Kulturen nötig sind (Fitnessfaktoren) (Hacker and Heesemann, 2002).

I.3.2.1. Dimorphismus

C. albicans ist in der Lage, in verschiedenen morphologischen Formen zu wachsen. Bei der Hefeform handelt es sich um ovale bis runde Zellen, welche sich durch Knospung und anschließender Trennung von Mutter – und Tochterzelle vermehren. Die zurückbleibende Geburtsnarbe ist durch eine veränderte Zelloberflächenstruktur gekennzeichnet, wodurch eine weitere Knospung an dieser Stelle erschwert ist.

Von den Hefezellen können sich auch filamentöse Wachstumsformen ausbilden, wobei zwischen Pseudohyphen und echten Hyphen unterschieden wird. Echte Hyphen sind durch Querwände (Septen) zwischen den einzelnen Abschnitten charakterisiert, wohingegen Pseudohyphen stattdessen Einschnürungen bilden, vergleichbar mit sprossenden Pilzen, die sich nach der Sprossung nicht trennen.

Eine weitere Erscheinungsform von *C. albicans* sind Chlamydosporen. Dabei handelt es sich um runde, dickwandige und im Vergleich zu den Hefen größere Zellen. Diese Zellform spielt vor allem bei der Diagnostik eine Rolle, eine biologische Funktion ist bisher noch nicht gezeigt worden.

Die Fähigkeit sowohl in einer Hefe – als auch einer filamentösen Form wachsen zu können, wird als Dimorphismus bezeichnet. Da *C. albicans* jedoch in mehr als zwei verschiedenen Morphologien zu beobachten ist, wird der Pilz zunehmend als „polymorph“ charakterisiert. Der Begriff „Dimorphismus“ wird jedoch weiterhin für die allgemeine Beschreibung des Wachstums in verschiedenen Morphologieformen benutzt.

Die jeweils vorrangige Wachstumsform von *C. albicans* ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Temperaturen unter 35°C und ein pH Wert unterhalb von 6,5, sowie Glukose als einziger Kohlenstoffquelle begünstigen das Wachstum in der Hefeform. Anzuchtbedingungen mit Temperaturen über 35°C und einem basischen bis leicht alkalischen pH Wert oberhalb von 6,5 führen zur Induktion des Hyphenwachstums. Zellen der stationären Phase oder Zellen, die anaeroben Verhältnissen oder Stresssituationen ausgesetzt sind, neigen ebenfalls zur Hyphenbildung.

Weitere Faktoren, welche die Hyphenbildung induzieren sind Serumbestandteile, der CO₂ Gehalt, „Quorum sensing“ – Signalmoleküle, Nahrungsmangel oder der Kontakt mit Oberflächen.

Chlamydosporen können *in vitro* auf nährstoffarmen Medien unter mikroaerophilen Bedingungen induziert werden. Alle beschriebenen Erscheinungsformen von *C. albicans* sind auch im Wirt aufzufinden, wobei Chlamydosporen extrem selten vorkommen (Calderone, 2002).

Die zelluläre Regulation des Hyphenwachstums umfasst in *C. albicans* mindestens drei Signaltransduktionswege. Einige der beteiligten Faktoren dieser Signaltransduktionswege konnten wegen bestehender Homologien zu Genen und Proteinen von *S. cerevisiae* identifiziert werden. Der Signalverlauf über den MAPKinase – Weg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Cph1, welcher wiederum die Hyphenbildung induziert (Ernst, 2000). Der cAMP – Weg reguliert ebenfalls das Hyphenwachstum. So hat eine Zufuhr von cAMP die Hypheninduktion zur Folge (Niimi, 1996). Der daran beteiligte Transkriptionsfaktor Efg1 kann auch durch andere Signaltransduktionswege aktiviert werden, wie zum Beispiel dem pH regulierten Rim101 – Weg, welcher ebenfalls die Ausbildung von Hyphen beeinflusst (Liu, 2002).

Die Repression der Hypheninduktion kann direkt, durch den generellen Transkriptionsrepressor Tup1 in Zusammenarbeit mit Rfg1 und Nrg1 erfolgen (Khalaf and Zitomer, 2001; Murad *et al.*, 2001b). Eine indirekte Repression resultiert aus der inaktivierenden Wirkung der Phosphatase Cpp1 auf den MAPKinase – Weg (Csank *et al.*, 1997).

Der Zusammenhang zwischen Dimorphismus und Virulenz wird bei Betrachtung verschiedener Morphologiemutanten deutlich. Die Transkriptionsaktivator – Doppelmutante $\Delta cph1/\Delta efg1$ ist in der Hefeform arretiert und im Mausmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997). Auch die hyperfilamentösen Mutantenstämme $\Delta tup1$ und $\Delta cpp1$ weisen eine verminderte Virulenz auf (Braun and Johnson, 1997; Csank *et al.*, 1997). Demnach kann nicht generell eine bestimmte Wachstumsform mit der Pathogenität von *C. albicans* in Verbindung gebracht werden. Vielmehr

müssen die Fähigkeit zum Dimorphismus, bzw. die damit assoziierten Genregulationen als essentiell für die Pathogenität angesehen werden (Mitchell, 1998).

I.3.2.2. Adhäsion

Die Adhäsion von *C. albicans* an die Wirtszelle ist Bestandteil der initialen Kontaktaufnahme. Sie kann im Wirt zur Auslösung einer Signalkaskade des Immunsystems führen, ist aber auch für die Virulenz des Pilzes von zwingender Bedeutung. Bereits in den 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Arten von *Candida* mit ungleichem Adhäsionsverhalten in ihrer Pathogenität unterscheiden. Eine starke Adhäsion geht dabei mit einer hohen Virulenz einher, wobei *C. albicans* in den entsprechenden Experimenten als deutlich adhärenter und virulenter beschrieben wurde (Douglas, 1987; King *et al.*, 1980).

Das Adhäsionsverhalten wird einerseits durch allgemeine Zelloberflächeneigenschaften (Hydrophobizität) oder auch durch einzelne Moleküle (Adhäsine) bestimmt.

Die Hydrophobizität wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel der Morphologie (Dimorphismus), der Temperatur, dem Glykosilierungszustand oder der Anwesenheit chemischer Detergenzien bzw. Antimykotika (Ellepola and Samaranayake, 1998; Masuoka and Hazen, 1997; Rodrigues *et al.*, 1999). Hydrophobe Zellen weisen eine stärkere Adhäsion, sowie eine höhere Resistenz gegenüber der Phagozytose auf als hydrophile Zellen (Masuoka and Hazen, 1997). Der Einsatz von Antimykotika, welche unter anderem die Hydrophobizität herabsetzten, hat eine Verringerung der Adhäsion an bukkale Epithelzellen zur Folge (Ellepola and Samaranayake, 1998). Diese Auswirkungen führen wiederum zu Veränderungen der Virulenzeigenschaften.

Zu den Adhäsinen von *C. albicans* gehören unter anderem die Mitglieder der Als (Agglutinin – Like Sequence) Familie. Diese umfasst acht glykosylierte

Proteine, welche eine Homologie zu α -Agglutinin aus *S. cerevisiae* aufweisen (Hoyer, 2001). Für α -Agglutinin konnte gezeigt werden, dass es bei der Zell – Zell – Erkennung während des „Mating“ Prozesses von Bedeutung ist (Cappellaro *et al.*, 1994). Die beiden Proteine Als1 und Als5 fungieren bei der Interaktion mit bukkalen Epithelzellen und Fibronectin als Adhäsine (Hoyer, 2001). Darüber hinaus spielt Als1 bei der Adhäsion an die orale Schleimhaut besonders im frühen Stadium der Infektion eine entscheidende Rolle (Kamai *et al.*, 2002).

Das hyphenspezifische Zellwandprotein Hwp1 ist als ein mögliches Substrat der Säugetiertransglutaminase an der Interaktion mit bukkalen Epithelzellen beteiligt (Staab *et al.*, 1996). Die Bedeutung dieser Wechselwirkung für die Virulenz, wird anhand des Verhaltens der $\Delta hwp1$ Mutante im Mausmodell deutlich, in dem eine Abschwächung der Pathogenität gegenüber dem Wildtyp zu beobachten ist (Staab *et al.*, 1999).

Die Deletion des *INT1* (Integrin – Like Protein Alpha Chain) – Gens hat sowohl eine reduzierte Adhäsion an Epithelzellen als auch eine abgeschwächte Virulenz im Mausmodell zur Folge (Kinneberg *et al.*, 1999). Weiterhin zeigen Stämme des normalerweise nicht – adhärenen Pilzes *S. cerevisiae* in Folge einer heterologen *INT1* Expression eine Adhäsion an humane HeLa – Zellen (Gale *et al.*, 1998). Diese Beobachtung und die Ähnlichkeit von Int1 zu dem humanen Integrin α M deuten auf eine Bedeutung des Int1 Proteins während der Adhäsionsprozesse.

Die korrekte Synthese des Zellwandbausteins Mannan, sowie der Grad der Glykosylierung von Mannan haben ebenfalls einen Einfluss auf die Adhäsion und Virulenz von *C. albicans*. Deletionen der Mannosyltransferase Gene *MNT1*, *PMT1*, *PMT6* führen jeweils zu einer verringerten Adhäsion und abgeschwächten Virulenz im Mausmodell (Buurman *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000).

I.3.2.3. Biofilmformation

C. albicans besitzt die Fähigkeit, Biofilme zu produzieren. Vor allem beim Einsatz medizinischer Geräte wie Dauerkatheter besteht das Risiko einer Biofilmentstehung. Dies ist insofern von besonderer klinischer Relevanz, da *C. albicans* Zellen in Biofilmkulturen gegenüber Antimykotika resistenter sind als planktonisch wachsende Zellen (Chandra *et al.*, 2001a). Darüber hinaus besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Virulenzpotential einzelner *Candida* spp. und der Befähigung zur Biofilmbildung (Hawser and Douglas, 1994).

Das Adhäsion und Biofilmformation bei der Besiedelung medizinischer Geräte in engem Zusammenhang stehen, zeigten Untersuchungen von Biofilmen, bei denen die ALS Gene stärker exprimiert vorlagen als in planktonischen Kulturen (Chandra *et al.*, 2001b).

I.3.2.4. Phänotypisches Switching

C. albicans ist in der Lage, zwischen verschiedenen Koloniemorphologien mit einer hohen Frequenz (10^{-4} bis 10^{-1} pro Generation) zu wechseln (Slutsky *et al.*, 1985). Besonderes Interesse gilt dem „white“ / „opaque“ Switching. Dabei handelt es sich um weiße, glatte, hemisphärische Kolonien mit runden bis ovalen Zellen („white“) bzw. graue, glatte, flache Kolonien mit länglich, ovalen Zellen („opaque“) (Slutsky *et al.*, 1987). In beiden Formen werden verschiedene, für die jeweilige Morphologie spezifische, virulenzassoziierte Gene exprimiert (Soll, 1997). „White“ Zellen sind im Adhäsionsversuch mit bukkalen Epithelzellen signifikant adhärenter. Im Gegensatz dazu besitzen die hydrophoberen „opaque“ Zellen eine deutlich höhere Fähigkeit zur Coadhäsion (indirekte Bindung an bukkale Epithelzellen durch Hefe – Hefe – Coadhäsion) (Kennedy *et al.*, 1988). Im Mausmodell der Hautinfektion sind „opaque“ Zellen deutlich virulenter als „white“ Zellen, was sich in einer erhöhten Kolonisierung und „Kavitation“ (oberflächliche Aushöhlung) der

Haut widerspiegelt. (Kvaal *et al.*, 1999; Tsuboi *et al.*, 1994) Im Mausmodell der systemischen *C. albicans* Infektion sind wiederum „white“ Zellen virulenter. Diese Beobachtungen sind auf das temperaturabhängige Switching von „white“ / „opaque“ Zellen zurückzuführen. „White“ Zellen sind bei der im systemischen Infektionsmodell vorherrschenden Temperatur von 37°C weitaus stabiler als „opaque“ Zellen. Letztere wechseln unter diesen Bedingungen zu über 90% in die „white“ Form (Slutsky *et al.*, 1987).

Eine essentielle Rolle kommt dem Switching bei der sexuellen Paarung (Mating) zu. Beide Vorgänge werden durch Genprodukte des „Mating Type Locus“ kontrolliert. Im Vergleich der beiden Switching Formen, sind „opaque“ Zellen effektivere Mating Partner als „white“ Zellen (Miller and Johnson, 2002).

Im Bezug auf die Virulenz besteht kein eindeutiger Vorteil eines bestimmten Morphologie – Phänotyps. Der Vorzug liegt wahrscheinlich vielmehr in der Befähigung zum Switching zwischen den Phänotypen, wodurch eine schnelle Anpassung an sich ändernde Lebensbedingungen ermöglicht wird. Möglicherweise gibt es aber insofern einen Zusammenhang zwischen Switching und Virulenz, als das Switching das Mating reguliert. Eine Mating Typ – abhängige Virulenz wurde zum Beispiel bei dem humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* nachgewiesen. Darüber hinaus wurde kürzlich postuliert, dass die Pheromonproduktion beim Mating die Biofilmbildung beeinflusst (Daniels *et al.*, 2006).

I.3.2.5. Sekretorische hydrolytische Enzyme

Neben der Bereitstellung und des Aufschlusses von Nährstoffen wird den sekretorischen, hydrolytischen Enzymen eine entscheidende Rolle während verschiedener Infektionsstadien zugeschrieben. *C. albicans* besitzt mindestens drei Familien von sekretorischen Hydrolasen. Zu ihnen zählen die Familie der sekretorischen Aspartatprotease (Sap), welche unter Punkt

I.4 genauer beschrieben wird, die Lipase (Lip) – Familie, sowie die Gruppe der Phospholipasen.

Die Lipase Genfamilie umfasst zehn Mitglieder (*LIP1 – LIP10*) (Hube *et al.*, 2000). Diese hohe Anzahl resultiert möglicher Weise aus der spezifischen Anpassung von *C. albicans* an verschiedene Bedingungen, auch während verschiedener Infektionsstadien. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzelnen Lipase Gene unterschiedlich exprimiert werden (Hube *et al.*, 2000; Stehr *et al.*, 2000).

Die heterogene Gruppe der Phospholipasen (PL) schließt die Untergruppen der PLA, PLB, PLC und PLD ein. Bei der PLD von *C. albicans* handelt es sich um ein Membran – assoziiertes Enzym (McLain and Dolan, 1997). Mit einem Assay, welcher die Aktivitäten von Phospholipasen A, B und C differenziert, konnte nur die extrazelluläre Aktivität einer PLB nachgewiesen werden (Ghannoum, 2000; Habermann and Hardt, 1972). Demnach handelt es sich bei sekretorischen Phospholipasen von *C. albicans* ausschließlich um Phospholipasen der Klasse B, von der zwei Gene (*PLB1* und *PLB2*) näher beschrieben wurden (Hoover *et al.*, 1998; Leidich *et al.*, 1998; Sugiyama *et al.*, 1999). Besonderes Augenmerk wird in den Untersuchungen auf *PLB1* gelegt. Ein Großteil der extrazellulären Phospholipaseaktivität wird dem Genprodukt von *PLB1* zugeschrieben, und es konnte gezeigt werden, dass *PLB1* während der Infektion exprimiert wird (Ghannoum, 2000). Die $\Delta plb1$ Mutante zeigt keinen Effekt auf die Adhäsion an humane Endothel – und Epithelzellen, ist aber durch eine abgeschwächte Invasion und Virulenz gekennzeichnet, was die Bedeutung der Phospholipase B1 während der Infektion unterstreicht (Leidich *et al.*, 1998).

I.3.2.6. Weitere virulenzassoziierte Faktoren

Neben den bereits beschriebenen Faktoren gibt es weitere Komponenten, deren Einfluss auf die Virulenz diskutiert wird. Zum Teil sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um den tatsächlichen Zusammenhang mit der Pathogenität darzustellen.

Für einige Gene konnte gezeigt werden, dass deren Expression in Abhängigkeit des pH Wertes auf bestimmte Infektionsbereiche beschränkt ist. Das im alkalischen pH Bereich exprimierte Gen *PHR1* ist im systemischen Mausmodell für die volle Virulenz erforderlich (Ghannoum *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist *PHR2* im sauren pH Milieu exprimiert und für die Virulenz im vaginalen Infektionsmodell von Bedeutung (De Bernardis *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen gehen mit den unterschiedlichen pH Werten im Blut (basisch) bzw. dem vaginalen Epithelgewebe (sauer) einher. Somit ist *C. albicans* durch spezifische Expressionsprofile an die lokal herrschenden pH Bedingungen angepasst.

Cutler und Mitarbeiter beschrieben 1972 Endotoxin – ähnliche Aktivitäten von mindestens zwei verschiedenen Zellwandkomponenten aus *C. albicans* (Cutler *et al.*, 1972). Auswirkungen dieser Beobachtungen auf die Pathogenität sind nicht auszuschließen, es liegen jedoch keine weiteren, aktuellen Daten zu diesem Aspekt vor.

Zu weiteren potentiellen Virulenzfaktoren gehören Transportermoleküle (ABC – bzw. Drug – Transporter), wie zum Beispiel die Genprodukte von *CDR1* oder *CDR2*, deren Spezifität und Expressionsregulation eine Rolle bei der Antimykotikaresistenz spielen (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997b).

C. albicans besitzt auf der Zelloberfläche Proteine, welche eine Ähnlichkeit zu Säugerzellrezeptoren aufweisen (Heidenreich and Dierich, 1985). Dieses als „molekulares Mimikry“ bezeichnetes Phänomen ermöglicht eine Verhinderung bzw. Verzögerung der humanen Immunabwehr, was für den Verlauf einer Infektion entscheidend sein kann (Calderone, 1989).

Eine strikte Einteilung und Benennung der verschiedenen Virulenzfaktoren ist nur bedingt möglich. Zum einen können virulenzassoziierte Gene auch Funktionen übernehmen, die in keinem ersichtlichen Zusammenhang mit der Pathogenität stehen. Zum anderen beruht die Virulenz auf dem Zusammenspiel und der Ergänzung der einzelnen Virulenzfaktoren in Abhängigkeit von den jeweiligen Bedingungen.

I.4. Sekretorische Aspartatproteasen von *Candida albicans*

C. albicans besitzt mindestens zehn verschiedene sekretorische Aspartatprotease (*SAP*) Gene. Die hohe Mitgliederzahl der Sap Familie lässt vermuten, dass diese, zu den Virulenzfaktoren zählenden Proteasen durch eine relativ spezifische Regulation an unterschiedliche Bedingungen angepasst sind.

Erste Hinweise auf eine extrazelluläre Proteaseaktivität erhielt Staib 1965 bei der Anzucht von *C. albicans* mit Serumproteinen als einziger Stickstoffquelle (Staib, 1965). Vermutungen zur Bedeutung der extrazellulären Proteaseaktivität im Zusammenhang mit der Virulenz formulierten Remold *et al.* aufgrund von Tierversuchen, bei denen nur proteolytische Stämme eine extensive Infektion zur Folge hatten (Remold *et al.*, 1968).

Die Klonierung und erste Beschreibung eines sekretorischen Aspartatprotease – Gens (*SAP1*) wurde 1991 veröffentlicht (Hube *et al.*, 1991). Kurz darauf wurde ein weiteres *SAP* Gen (*SAP2*) kloniert und sequenziert (Wright *et al.*, 1992). Mit Hilfe der *SAP1* Sequenzdaten konnten, unter Verwendung verschiedener Hybridisierungstechniken weitere Mitglieder der *SAP* Gen Familie identifiziert werden (White *et al.*, 1993). Der Begriff „*SAP* Familie“ wurde erstmals geprägt, nachdem nachgewiesen wurde, dass es mehr als zwei *SAP* Gene geben muss (Magee *et al.*, 1993). Zuvor wurde eine Reihe von unterschiedlichen Bezeichnungen für die Aspartatproteasen verwendet. Bei der Sequenzierung des stromaufwärts – Bereiches des *SAP1* Gens konnte ein weiteres Familienmitglied, *SAP4*,

identifiziert werden (Miyasaki *et al.*, 1994). Die selektive Untersuchung einer genomischen Bibliothek mit einer *SAP1* Sonde führte zur Isolierung und Sequenzierung weiterer *SAP* Gene: *SAP5*, *SAP6* und *SAP7* (Monod *et al.*, 1994). Aus diesen neu gewonnenen Daten wurden wiederum Sonden konstruiert, mit deren Hilfe erste Anzeichen auf das Vorhandensein zweier weiterer sekretorischer Aspartatproteasen erhalten wurden (Monod *et al.*, 1994). Das vorerst letzte Mitglied der *SAP* Familie, *SAP10* wurde im Rahmen des *C. albicans* Genomprojekts identifiziert und sequenziert (Accession Number AF146440 und CandidaDB, <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>).

I.4.1. Struktur und Prozessierung der sekretorischen Aspartatproteasen

Alle Mitglieder der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen von *C. albicans* (Saps) haben den gleichen strukturellen Aufbau. Die zehn *SAP* Gene kodieren für Präproenzyme, welche einen prozessierenden und sekretorischen Transportweg durchlaufen.

Das N – terminale Signalpeptid wird von einer Signalpeptidase im endoplasmatischen Retikulum erkannt und proteolytisch entfernt. Ein bei dieser Prozessierung entstandenes Proenzym wird im Golgi Apparat in die reife, aktive Form des Proteins überführt. Bei dem dabei prozessierenden Enzym, handelt es sich vermutlich um die Subtilisin – ähnliche Kex2 Serinprotease. Die Notwendigkeit von Kex2 für die korrekte Prozessierung konnte für Sap2 eindeutig gezeigt werden (Newport and Agabian, 1997). Es werden jedoch auch alternative bzw. autokatalytische Prozessierungsmöglichkeiten diskutiert (Koelsch *et al.*, 2000; Togni *et al.*, 1996). Das reife Protein wird durch vesikulären Transport zur Zelloberfläche und Sekretion gebracht. Eine mögliche Ausnahme sind hierbei die beiden Proteasen Sap9 und Sap10, welche in ihrer Proteinsequenz putative Konsensussequenzen, typisch für Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine aufweisen (Hube and Naglik, 2001).

Zu weiteren strukturellen Merkmalen aller Mitglieder der Sap Familie gehören die, für die Ausbildung von Disulfidbrücken benötigten Cysteinreste, von denen alle Saps mindestens vier aufweisen. Im aktiven Zentrum der Proteasen befinden sich zwei für Aspartatproteasen charakteristische Aspartatreste. Auf der Basis der existierenden Primärsequenzen ist auch eine begrenzte Glykosylierung der Saps nicht ausgeschlossen.

I.4.1.1. Strukturelle Ähnlichkeiten der Aspartatproteasefamilien aus *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*

In *S. cerevisiae* existiert ebenfalls eine Familie von Aspartatproteasen (Yapsine, Yps). Sie besteht aus sechs möglichen Mitgliedern, wobei Yps5 nur aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu diesen Aspartatproteasen, als putatives Mitglied dieser Familie zählt (*Saccharomyces* Genome Database, SGD). In ihrer Proteinsequenz sind die Aspartatproteasen aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* einander ähnlich. Im Gegensatz zu den Sap Proteinen von *C. albicans* sind jedoch alle Mitglieder der Aspartatproteasefamilie aus *S. cerevisiae* GPI verankert.

Die GPI Verankerung erfolgt bei Eukaryoten durch eine C-terminale Modifikation der Proteine. Der Glykolipidanker wird im endoplasmatischen Retikulum durch einen Transamidasekomplex kovalent an die so genannte Omegaposition des C-Terminus gebunden (Fraering *et al.*, 2001). Der weitere Transport zur Zelloberfläche erfolgt möglicher Weise getrennt von anderen sekretorischen Proteinen (Muniz *et al.*, 2001). Neben der Verankerung in der Plasmamembran ist, einmalig für Pilze, auch eine Bindung an die Zellwand möglich. Dazu wird ein Großteil des GPI Ankers durch einen noch unbekanntem Mechanismus abgespalten, und der verbleibende Rest durch Transglykosilation kovalent an das β 1,6-Glukan der Zellwand gebunden (Klis *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1994; Van Der Vaart *et al.*, 1996). Den GPI Zellwandproteinen wird eine zentrale Rolle bei der Organisation der Zellwand zugeschrieben (Kapteyn *et al.*, 1999).

Die beiden Proteine Yps1 und Yps2 wurden im Rahmen einer Analyse der $\Delta kex2$ Mutante von *S. cerevisiae* identifiziert. Beide Proteasen waren in der Lage, Phänotypen der $\Delta kex2$ Mutante zu unterdrücken und Proproteine zu prozessieren, welche zu den Substraten der, im trans – Golginetzwerk lokalisierten Protease Kex2 gehören (Egel-Mitani *et al.*, 1990; Komano and Fuller, 1995). Ähnlich wie die Kex2 Protease prozessieren Yps1, Yps2 (zuvor als Mkc7 bezeichnet) und Yps3 Proteine oder Peptide an basischen Aminosäurereste (Cawley *et al.*, 1996; Komano *et al.*, 1999).

I.4.2. Biochemische Eigenschaften der sekretorischen Aspartatproteasen

Das bisher am gründlichsten untersuchte Mitglied der Sap Familie ist die Protease Sap2. Dieses Protein ist unter den meisten *in vitro* Anzuchtbedingungen mit Protein als einziger Stickstoffquelle die dominante Protease im Kulturüberstand. Aus diesem Grund beziehen sich die meisten biochemischen Daten von aufgereinigten extrazellulären Proteasen aus Kulturüberständen von *C. albicans* auf Sap2. Weitere Untersuchungen der Eigenschaften der einzelnen Sap Familienmitglieder schließen die Expression in *Escherichia coli* oder *Pichia pastoris* ein (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998; Koelsch *et al.*, 2000). Abweichungen aufgrund unterschiedlicher biochemischer Modifikationen in Abhängigkeit des gewählten Expressionssystems können daher nicht ausgeschlossen werden.

Bislang vorliegende biochemische Daten umfassen hauptsächlich die Proteasen Sap1 bis Sap6. Deren Molekulargewicht liegt bei zirka 40 kDa (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998). Die jeweilige Aktivität in Abhängigkeit vom pH Wert unterteilt diese sechs Proteasen in zwei Untergruppen. Sap1 bis Sap3 bilden eine Gruppe, bei der die höchste Aktivität der Proteasen in einem pH Bereich von 3,2 bis 4,5 liegt. Zur anderen Gruppe gehören Sap4 bis Sap6, welche ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH Wert von 5,0 erreichen.

Der von Sap1 bis Sap6 umfasste pH Bereich reicht von 2,0 bis 7,0 (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998).

Für die Proteasen Sap1 bis Sap3 konnte gezeigt werden, dass sie bei Temperaturen bis zu 45°C thermal stabil und auch bei 50°C noch 60% ihrer Aktivität aufweisen (Smolenski *et al.*, 1997).

Die vier Proteasen Sap1 bis Sap3 und Sap6 wurden weiterhin auf ihre Substratspezifität hin untersucht (Koelsch *et al.*, 2000). Alle spalten bevorzugt Peptidbindungen zwischen hydrophoben Aminosäuren (AS). Wobei Sap1, Sap2 und Sap6 Phenylalanin und Sap3 Leucin an der P(1) Position bevorzugen. Es können aber auch positiv geladene AS an dieser Position vorhanden sein, um von Sap2 und Sap3 erkannt zu werden. Alle vier Proteasen besitzen ein breiteres Substratspektrum an Position P(1'). Alanin wird an dieser Stelle von allen untersuchten Proteasen als Substrat akzeptiert, wobei Sap1 bis Sap3 Tyrosin bevorzugen. Zudem können sich auch AS mit sauren Seitenketten an der P(1') Position befinden (Koelsch *et al.*, 2000).

I.4.3. Humane Substrate der sekretorischen Aspartatproteasen

In Bezug auf die Interaktion von *C. albicans* und dem humanen Wirt wird den sekretorischen Aspartatproteasen eine möglicherweise entscheidende proteolytische Rolle zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Protease – sekretierende Stämme strukturelle Wirtsproteine, wie zum Beispiel Proteine des Stratum Corneum, Fibronectin, Laminin oder Mucin degradieren (Colina *et al.*, 1996; Morschhauser *et al.*, 1997; Negi *et al.*, 1984). Darüber hinaus sinkt die Proteinkonzentration des Speichel mit steigender SAP Genexpression, was für eine proteolytische Aktivität der Aspartatproteasen in der Mundhöhle spricht (Wu and Samaranayake, 1999). Eine Modulation der Immunantwort durch die Saps ist aufgrund der nachgewiesenen Degradation von Immunglobulinen und der Prozessierung

von Interleukinen ebenfalls denkbar (Beausejour *et al.*, 1998; Rüchel *et al.*, 1982; Rüchel, 1986).

Die Hydrolyse humaner Proteine kann für den Pilz verschiedene Vorteile haben. Proteolytische Aktivität wird nicht nur mit der Versorgung mit Nährstoffen in Verbindung gebracht, sondern kann den Pilz auch vor dem Immunsystem schützen, die Adhäsion und Invasion des Pilzes begünstigen, oder Prozesse des Wirtes zu Gunsten des Pilzes modifizieren.

I.4.4. Bedeutung der sekretorischen Aspartatproteasen als Virulenzfaktor

Erste Hinweise auf den Einfluss der sekretorischen Aspartatproteasen auf die Virulenz von *C. albicans* wurden durch den Einsatz von Pepstatin A erhalten. Dieses Hexapeptid inhibiert Aspartatproteasen und reduziert oder verhindert die Adhärenz und Invasion von *C. albicans* (Ollert *et al.*, 1993; Schaller *et al.*, 1999).

Untersuchungen von Einzel-, Doppel-, oder auch Dreifachmutanten, bei denen verschiedene *SAP* Gene ausgeschaltet wurden, haben gezeigt, dass die verschiedenen Sap Proteine in Abhängigkeit vom Infektionsstadium oder -ort von unterschiedlicher Relevanz für die Pathogenität sind. Die Proteasen Sap1 bis Sap3 scheinen vorrangig bei Oberflächeninfektionen eine Rolle zu spielen, da Mutanten denen diese Enzyme fehlen in oralen und vaginalen Hautmodellen eine verringerte Virulenz aufweisen (De Bernardis *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu bewirkt die Deletion der Gene *SAP4* bis *SAP6* eine deutliche Abschwächung der Virulenz in Untersuchungen der systemischen Infektion (Kretschmar *et al.*, 1999; Sanglard *et al.*, 1997a). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von *SAP4* bis *SAP6* in Folge der Phagozytose durch Makrophagen deutlich anstieg und die entsprechende Dreifachmutante in diesen Versuchen signifikant effektiver abgetötet wurde (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998).

Diese Beobachtungen gehen mit der Vorstellung einher, dass die hohe Mitgliederanzahl der Sap Familie auf eine unterschiedliche Spezifität der einzelnen Enzyme zurückzuführen ist.

I.4.4.1. Sekretorische Aspartatproteasen und deren Zusammenspiel mit anderen Virulenzfaktoren

Die Bedeutung der sekretorischen Aspartatproteasen für die Virulenz von *C. albicans* wird auch im Zusammenhang mit anderen Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel dem Dimorphismus, der Adhäsion oder dem Switching deutlich. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression der Proteasen *SAP4* bis *SAP6* vorrangig in der Hyphenform des Pilzes nachweisbar ist. Dabei sind der neutrale pH Wert und die serumbedingte Hypheninduktion ausreichend für die Induktion der Expression dieser Gene (Hube *et al.*, 1994). Sequenzanalysen der Promotorregionen der Gene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* ergaben potentielle Konsensussequenzen des Transkriptionsfaktors Tec1 für alle drei Gene. Die Möglichkeit einer verknüpften Regulation der Hypheninduktion und *SAP4* bis *SAP6* Expression durch Tec1 besteht aufgrund beobachteter Phänotypen der $\Delta tec1$ Mutante. Diese ist weder zur Hyphenbildung noch zur Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* befähigt (Schweizer *et al.*, 2000).

Bereits vor zwanzig Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen der Protease Aktivität und der Adhäsion von *C. albicans* postuliert. Die Wechselbeziehung besteht dabei in der zunehmenden Adhärenz an bukkale Epithelzellen mit steigender proteolytischer Aktivität der entsprechenden *C. albicans* Stämme (Ghannoum and Abu Elteen, 1986). Für eine mögliche Verbindung bestimmter Sap Enzyme und der Adhäsion sprechen auch Untersuchungen mit verschiedenen HIV Protease Inhibitoren. Sap1 bis Sap3, aber nicht Sap4 bis Sap6 werden durch Ritonavir, Saquinavir, Indinavir und Nelfinavir in ihrer Aktivität gehemmt (Borg-von Zepelin *et al.*, 1999). Der Einsatz der Inhibitoren Ritonavir, Saquinavir und zum Teil auch Indinavir

bewirkt außerdem die Abschwächung der Adhäsion von *C. albicans* an verschiedene *in vitro* Zellkulturen, wodurch eine Rolle der Proteasen Sap1 bis Sap3 während des Adhäsionsprozesses vorstellbar ist (Bektic *et al.*, 2001; Borg-von Zepelin *et al.*, 1999).

Das Switching zwischen der „white“ (W) – und „opaque“ (O) Form ist ebenfalls mit einer spezifischen *SAP* Genexpression verbunden. *SAP1* ist das erste Switching – regulierte Gen, welches in *C. albicans* beschrieben wurde (Morrow *et al.*, 1992). Neben *SAP1* ist auch *SAP3* spezifisch in „opaque“ Zellen des WO-1 Stammes exprimiert (White *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu wird Sap2 auch in der „white“ Form sekretiert (White and Agabian, 1995). *SAP8* ist ebenfalls in „opaque“ Zellen nachweisbar. Da jedoch die *SAP8* Expression bei 25°C hochreguliert und die „opaque“ Form nur bei diesen Temperaturbedingungen stabil ist, wird *SAP8* eher Temperatur – als Switching – abhängig reguliert sein (Monod *et al.*, 1998; Slutsky *et al.*, 1987). Inwieweit die spezifische *SAP* Genexpression in direktem oder indirektem Zusammenhang mit dem jeweiligen Switchingtyp steht, ist weitgehend unbekannt. Für das „opaque“ spezifische Gen *SAP1* konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass dessen erzwungene Expression in „white“ Zellen die Adhäsion und Kavitationsfähigkeit dieser Zellen erhöht und dem Niveau der „opaque“ Zellen angleicht (Kvaal *et al.*, 1999).

1.4.5. Expression der sekretorischen Aspartatproteasen *in vitro*

Die Zusammensetzung der *SAP* Familie aus mindestens zehn Mitgliedern lässt bereits die Vermutung einer unterschiedlichen Regulation der einzelnen *SAP* Gene zu. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression der *SAPs* von verschiedenen Faktoren in unterschiedlicher Spezifität beeinflusst wird.

Wie bereits unter Punkt 1.4.4.1 beschrieben, ist *SAP1* durch Switching reguliert. „Opaque“ Zellen weisen einen hohen *SAP1* mRNA Gehalt auf, welcher in Folge des „Switching“ zur „white“ Form deutlich

absingt (Morrow *et al.*, 1993). Zu den weiteren von „opaque“ Zellen sekretierten Proteasen gehören Sap2 und Sap3 (White and Agabian, 1995). Die SAP2 Expression ist jedoch stammunabhängig in „white“ und „opaque“ Zellen zu beobachten (Kvaal *et al.*, 1999).

Darüber hinaus wird SAP2 unter vielen proteaseinduzierenden Bedingungen exprimiert. Die Regulation erfolgt dabei über einen positiven Feedback – Mechanismus, bei dem die SAP2 Expression durch Peptide induziert und hohen Konzentrationen von Aminosäuren reprimiert wird (Hube *et al.*, 1994). Ein neutraler pH Wert sowie hypheninduzierende Konditionen begünstigen vorrangig die Expression der Gene SAP4 bis SAP6 (Hube *et al.*, 1994). Die Wahrscheinlichkeit einer im Zusammenhang stehenden Regulation der Hypheninduktion und SAP4 bis SAP6 Expression durch den Transkriptionsfaktor Tec1 wurde bereits unter I.4.4.1 beschrieben (Schweizer *et al.*, 2000).

SAP7 weicht in sofern von allen anderen sekretorischen Aspartatproteasen ab, als dass eine Expression *in vitro* unter den geschilderten Bedingungen nicht nachweisbar ist (Hube *et al.*, 1994).

Proteaseinduzierende Anzuchtbedingungen bei 25°C führten zur Induktion der SAP8 Genexpression, vor allem in der frühlogarithmischen Phase. Dies wurde ebenfalls, jedoch in geringerer Intensität bei einer Anzuchttemperatur von 37°C beobachtet (Monod *et al.*, 1998).

Im Zusammenhang mit den Studien zur SAP8 Genexpression wurde ebenfalls die vorhandene Menge der SAP9 mRNA bestimmt. Dabei konnte eine geringe Expression in den meisten untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden. Eine deutliche Expressionssteigerung wurde für die Anzucht bei 25°C nach 45 Stunden beschrieben (Monod *et al.*, 1998).

Informationen zur Expression des jüngsten SAP Familienmitgliedes, SAP10, liegen in der Literatur nicht vor.

Die durchgeführten Expressionsstudien unter verschiedenen *in vitro* Anzuchtbedingungen haben gezeigt, dass die einzelnen Mitglieder der SAP Familie auf unterschiedliche Weise reguliert sind.

I.4.6. Expression der sekretorischen Aspartatproteasen in Infektionsmodellen

Der Einsatz von künstlichen Haut – oder *in vivo* Tiermodellen bietet die Möglichkeit die Rolle von Sap Proteasen unter Bedingungen zu untersuchen, die einer humanen Infektion ähnlich sind. Dabei sind sowohl Analysen der Expression während verschiedener Infektionsstadien möglich, als auch Untersuchungen zur Auswirkungen von Gendelektionen auf die Virulenz von *C. albicans*.

In vitro Modelle von kutanen oder oralen rekonstituierten humanen Epithelzellen (RHE) haben gezeigt, dass *SAP1* bis *SAP3* während einer Oberflächeinfektion exprimiert werden (Schaller *et al.*, 1998b; Schaller *et al.*, 2000). Die Proteasen Sap4 bis Sap6 scheinen bei diesem Infektionstyp nur eine untergeordnete Rolle zu haben, da eine entsprechende $\Delta sap4/\Delta sap5/\Delta sap6$ Tripelmutante im Gegensatz zu den Mutanten $\Delta sap1$, $\Delta sap2$, $\Delta sap3$ und $\Delta sap1/\Delta sap3$ keine Abschwächung der Schädigung der Epithelzellen hervorruft (Schaller *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen werden durch ein *in vivo* vaginales Rattenmodell bekräftigt, bei dem Transkripte von *SAP1* und *SAP2* nachgewiesen werden konnten (De Bernardis *et al.*, 1995). Deletionen der Gene *SAP1*, *SAP2* oder *SAP3* führen im Gegensatz zur $\Delta sap4/\Delta sap5/\Delta sap6$ Tripelmutante in diesem *in vivo* Modell zu einer Virulenzverringerng (De Bernardis *et al.*, 1999).

Im *in vivo* Mausmodell der systemischen Infektion zeigt sich ein entgegengesetztes Bild. Hier spielen *SAP4* bis *SAP6* nach einer intravenösen (i. v.) Infektion eine entscheidende Rolle, wobei die starke Expression von *SAP5* bei i. v. und intraperitonealen Infektionen hervorzuheben ist (Staib *et al.*, 2000). Übereinstimmend dazu verhalten sich die entsprechenden Mutanten. Vorrangig die Tripelmutante $\Delta sap4/\Delta sap5/\Delta sap6$ zeigt eine Verringerung der Schädigung des Gewebes, der Invasion und der Letalität im *in vivo* Modell (Kretschmar *et al.*, 1999; Sanglard *et al.*, 1997a).

Eine mit der Hyphenbildung assoziierte *SAP6* Expression wurde auch im kutanen Epithelmodell verzeichnet (Schaller *et al.*, 2000). Im gleichen Modell waren ebenfalls Transkripte von *SAP8* nachweisbar (Schaller *et al.*, 2000). Eine Expression der Gene *SAP7*, *SAP9* und *SAP10* wurde in den beschriebenen Analysen nicht beobachtet oder nicht untersucht.

I.4.7. Expression der sekretorischen Aspartatproteasen *in vivo*

Die Versuche mit verschiedenen Infektionsmodellen haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen bestimmten Infektionsstadien oder Infektionsarten mit spezifischen Sap Aktivitäten bestehen kann.

Das die sekretorischen Aspartatproteasen bei *C. albicans* Infektionen des Menschen tatsächlich von Bedeutung sind, wird auch anhand der hohen Titer von Anti – Sap – Antikörper in Sera von Candidosepatienten deutlich (Rüchel, 1992)

Die Untersuchungen der *SAP* Expression in Proben von Patienten mit einer oralen Candidose ergaben ein ähnliches Muster wie im oralen *in vitro* RHE Infektionsmodell (siehe auch I.4.6). Auch hier sind die Gene *SAP1* bis *SAP3* vorrangig exprimiert, sowie geringe Mengen des *SAP6* Transkriptes nachweisbar (Schaller *et al.*, 1998b). Weitere Analysen zur Genexpression in Patienten ergaben zusätzliche Informationen, die von den Ergebnissen der *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodelle zum Teil abweichen. So konnte in Patientenproben die Expression der Gene *SAP1* bis *SAP7* im Zusammenhang mit einer oralen Candidose dokumentiert werden (Naglik *et al.*, 1999). Interessanterweise wurde bei diesen Untersuchungen deutlich, dass zwischen Patienten mit einer Candidose und *Candida* Trägern ohne Symptomen unterschieden werden kann, da Transkripte von *SAP1* und *SAP3* vor allem in den Patienten mit Candidose nachweisbar waren und nur in geringerem Ausmaß bei Trägern (Naglik *et al.*, 1999).

I.5. Ziel der Arbeit

Die sekretorischen Aspartatproteasen (Saps) gehören zu den meistdiskutierten Virulenzfaktoren von *C. albicans* und scheinen vielfältige Funktionen zu haben. Die Regulation der Expression dieser Proteasen scheint auch mit anderen Virulenzfaktoren des Pilzes, wie zum Beispiel dem Dimorphismus in Zusammenhang zu stehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher die *SAP* Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktormutanten, welche durch eine abnormale Morphologie gekennzeichnet sind unter hypheninduzierenden *in vitro* Bedingungen analysiert werden. Weiterhin bestand die Möglichkeit, *in vivo* Proben aus einem Mausmodell von Infektionen mit einigen dieser Transkriptionsfaktormutanten auf mögliche Unterschiede der *SAP* Genexpression zu untersuchen.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit sollte jedoch die Charakterisierung der bisher wenig untersuchten Aspartatproteasen Sap9 und Sap10 sein. Diese beiden jüngsten Mitglieder der Sap Familie unterschieden sich nach vorläufigen Sequenzanalysen von den anderen Familienmitgliedern durch eine putative Konsensussequenz für eine GPI Verankerung. Es sollte versucht werden nachzuweisen, ob Sap9 und Sap10 tatsächlich durch eine GPI Verankerung an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

Zur Durchführung funktioneller Untersuchungen von Sap9 und Sap10 sollten zunächst die entsprechenden Einzel – und Doppelmutanten, sofern noch nicht vorhanden, hergestellt werden. Für eine weitere Charakterisierung der beiden Proteasen war die Klonierung und Herstellung von Retransformanten – und Überexpressionsvektoren geplant.

Ein phänotypisches Screening und Genexpressionprofile der verschiedenen Mutanten und Kontrollstämme sollten Hinweise auf mögliche Funktionen dieser beiden Proteasen geben. Die Möglichkeit einer überlappenden Funktion von Sap9 und Sap10 untereinander oder auch mit der, im trans – Golginetzwerk lokalisierten Endoprotease Kex2 sollte mit Hilfe der Überexpressionskonstrukte in den jeweiligen Einzelmutanten untersucht

werden. Weiterhin bestand die Aufgabe, die Bedeutung von Sap9 und Sap10 für die Virulenz des Pilzes anhand von *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen zu untersuchen.

Mit Hilfe von aufgereinigten Proteasen sollte schließlich die Substratspezifität von Sap9 und Sap10 untersucht werden.