

Zusammenfassung

Über 50 % der gesunden Bevölkerung sind Träger von Pilzen der Gattung *Candida*. Dazu gehört der häufigste humanpathogene Pilz dieser Gattung: *C. albicans*. Das Immunsystem und Bakterien der natürlichen mikrobiellen Flora des Menschen sind in der Lage, *C. albicans* als Kommensale zu kontrollieren. Kommt es jedoch zur Beeinträchtigung der Immunabwehr oder Schädigung der Mikroflora, kann dies zu oberflächlichen, in schweren Fällen auch zu systemischen *C. albicans* Erkrankungen führen.

Die Pathogenese von *C. albicans* Infektionen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Auf der Seite des Pilzes sind Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel der Dimorphismus, die Adhäsion oder sekretorische, hydrolytische Enzyme von entscheidender Bedeutung. Dazu zählt auch die Familie der sekretorischen Aspartatproteasen. Bisher wurden zehn Mitglieder beschrieben. *In silico* Studien der vorliegenden Arbeit schließen jedoch die Existenz eines weiteren Mitgliedes nicht aus. Sequenzähnlichkeiten der jeweiligen Sap Proteine und bisherige Untersuchungen zu den Genen *SAP1* bis *SAP6* deuten auf eine funktionelle Spezialisierung einzelner Subgruppen dieser Familie. Computergestützte Analysen der Promotorregionen aller *SAP* Gene sprechen aufgrund putativer Transkriptionsfaktorbindestellen für eine differenzielle Regulation der *SAP* Genexpression. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen der *SAP* Genexpression in verschiedenen Mutanten, denen bestimmte Transkriptionsfaktoren fehlen, bestätigen diese Ergebnisse. Bei dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1, welche bei der Regulation des Dimorphismus von zentraler Bedeutung sind, auch an der Expressionsregulation der Gene *SAP4* bis *SAP6* beteiligt sind. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die abgeschwächte Virulenz von $\Delta cph1$ und $\Delta efg1$ Mutanten zumindest teilweise auf eine fehlende *SAP4* bis *SAP6* Expression zurückzuführen ist.

Innerhalb der Sap Familie nehmen die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern dieser Familie sind diese Proteasen stark glykosiliert und auf der Zelloberfläche

über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankert. Durch die Herstellung von Protease – Gfp – Fusionsproteinen konnte eine Zelloberflächenlokalisation bestätigt werden, wobei Sap9 Antigene vorrangig in der Zellmembran und Sap10 Antigene auch in der Zellwand nachgewiesen wurden.

Durch Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* und durch Analyse der entsprechenden Einzel – und Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass beide Proteasen sowohl eine wichtige Funktion bei der Integrität der Zelloberfläche haben, als auch an Zelltrennungsprozessen während der Vermehrung durch Sprossung beteiligt sind. Damit konnte erstmals bei Sap Proteasen eine zelluläre Funktion demonstriert werden. Sowohl Sap9, als auch Sap10 schneiden an basischen bzw. dibasischen Sequenzmotiven und weisen ein Prozessierungsmuster auf, welches dem der Yapsine oder der Kex2 Protease aus *Saccharomyces cerevisiae* ähnelt. Die Überexpression des *SAP9* Gens in den Mutanten $\Delta kex2$ und $\Delta sap10$, bzw. des *SAP10* Gens in den Mutanten $\Delta kex2$ und $\Delta sap9$ von *C. albicans* führte jedoch nur zu einer teilweisen Wiederherstellung der Wildtyp – Phänotypen. Daher muss angenommen werden, dass Sap9 und Sap10 (sowie Kex2) zwar funktionell überlappen, aber verschiedene, spezifische, pilzeigene Substrate prozessieren. Darüber hinaus ist eine Autoprozessierung von Sap9 wahrscheinlich. Weiterhin führt die Deletion von *SAP9* und *SAP10* zu einem veränderten Adhäsionsverhalten gegenüber oralen Epithelzellen und bewirkt entweder eine verstärkte ($\Delta sap9$) oder eine abgeschwächte Adhäsion ($\Delta sap10$). Beide Mutanten zeigten jedoch eine signifikant verringerte Fähigkeit, orales Epithelgewebe im oralen Schleimhautmodell zu schädigen. Somit besitzen die Proteasen Sap9 und Sap10 Funktionen, welche sowohl mit zellulären Prozessen, aber auch mit Wirt – Pilz Interaktionen assoziiert sind. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit wird postuliert, dass die Proteasen Sap9 und Sap10 Pilzproteine prozessieren, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind oder diese passieren und am strukturellen Aufbau der Zelloberfläche sowie an Adhäsionsprozessen beteiligt sind.