

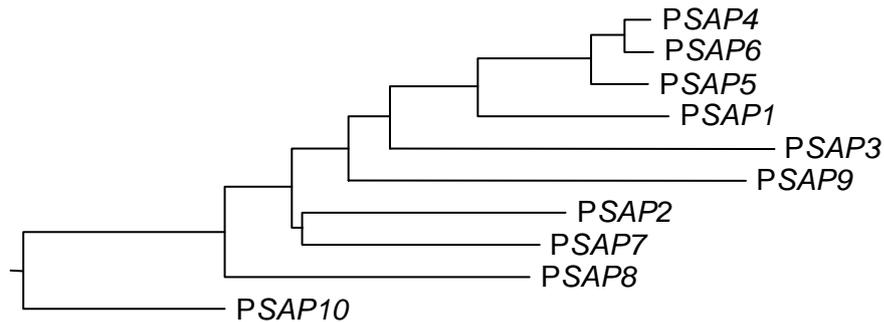
### III. Ergebnisse

#### III.1. Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Expression der sekretorischen Aspartatproteasen

##### III.1.1. *In silico* Analyse der SAP Promotorsequenzen

Die Genfamilie der sekretorischen Aspartatproteasen (SAPs) umfasst zehn Mitglieder. Funktionelle Spezialisierungen und somit mögliche Expressionsunterschiede der einzelnen Proteasen sind aufgrund dieser Anzahl vorstellbar und konnten bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. So werden die Gene *SAP2* und *SAP3* in Medien mit Protein als einziger Stickstoffquelle exprimiert, während die Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* hyphenassoziiert ist. *In silico* Untersuchungen der Promotorregionen von *SAP1* bis *SAP10* sollten Aufschluss über die Expressionsregulation innerhalb der SAP Familie geben.

Durch ein Alignment der DNA Sequenzen, welche den Bereich von 999 Basenpaaren stromaufwärts vom Startcodon ATG der SAP Gene umfassen, können mögliche Ähnlichkeiten der verschiedenen Promotorregionen erkannt werden. In Abbildung 1 ist das Dendrogramm dieses Alignments dargestellt. Dabei ist eine Clusterbildung der Promotorregionen der Gene *SAP4* bis *SAP6* zu verzeichnen. Dieses Ergebnis ist konform zu den bereits erwähnten Expressionsdaten. Weitere deutliche Cluster sind nicht zu erkennen. Dies schließt jedoch eine ähnliche Expressionsregulation der jeweiligen SAP Gene nicht aus, da hierfür hauptsächlich bestimmte, relativ kurze DNA Sequenzen, die als Bindedomäne für einen entsprechenden Transkriptionsfaktor dienen, nötig sind, und somit eine hohe Homologie über die gesamte Promotorregion nicht erkennbar sein muss.



**Abbildung 1. Dendrogramm der Promotorregionen der Gene *SAP1* bis *SAP10***  
 Das Alignment der DNA Sequenzen, welche 999 Basenpaare stromaufwärts des jeweiligen Startcodons der Gene *SAP1* bis *SAP10* umfassen, zeigt eine Clusterbildung der Promotorbereiche der Gene *SAP4* bis *SAP6*.

### III.1.1.1. Putative Transkriptionsfaktoren der *SAP* Gene

Mit Hilfe der frei zugänglichen Software MIRAGE (Molecular Informatics Resource for the Analysis of Gene Expression, [www.ifti.org](http://www.ifti.org)) des Institute for Transcriptional Informatics (IFTI, USA) und unter Berücksichtigung bereits veröffentlichter Daten zu Transkriptionsfaktorenbindestellen aus *C. albicans*, können die Sequenzen der *SAP* Promotorregionen analysiert werden. Da das Programm MIRAGE auf Daten von *S. cerevisiae* beruht, weicht die Bezeichnung der Transkriptionsfaktoren in *C. albicans* zum Teil ab. Eine Zusammenfassung der identifizierten Transkriptionsfaktorenbindestellen gibt Tabelle 1 wieder.

**Tabelle 1. Transkriptionsfaktoren, welche putative DNA Bindestellen innerhalb der Promotorregionen der Gene *SAP1* bis *SAP10* besitzen**

Site Name	Transkriptionsfaktor	DNA Sequence	Referenz
Cap1	Cap1	TTANTAA	(Chen <i>et al.</i> , 2004)
PRE site	Cph1 (homolog zu <i>S.c.Ste12</i> )	TGAAACA	(Lockhart <i>et al.</i> , 2003)
E-Box	für Proteine mit bHLH-Motiv (z.B. Efg1)	CANNTG	(Leng <i>et al.</i> , 2001)
GCRE	Gcn4	TGANTN	(Hinnebusch and Fink, 1983)

Site Name	Transkriptionsfaktor	DNA Sequence	Referenz
Mig1	Mig1	(C) <sub>4</sub> RNN(W) <sub>5</sub>	(Sinha and Tompa, 2002)
NRE	Nrg1	MVCCCT	(Murad <i>et al.</i> , 2001b)
Rim1	Rim101	GCCAAG	(Fernandez-Martinez <i>et al.</i> , 2003)
Rlm1	Rlm1	TAW <sub>4</sub> TAG	(Jung and Levin, 1999)
TEA/ATTS	Tec1	CATTCY	(Schweizer <i>et al.</i> , 2000)
Tup1	Tup1	ACCCC	(Wang <i>et al.</i> , 2002)

Bei einigen der identifizierten potentiellen Bindestellen handelt es sich um DNA Sequenzen, welche von verschiedenen Transkriptionsfaktoren erkannt werden, wie zum Beispiel der E-Box, an welche generell Proteine mit basischem Helix – Loop – Helix Motiv binden können. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist der Transkriptionsfaktor Efg1 (enhanced filamentous growth factor) (Stoldt *et al.*, 1997). Ein weiteres Beispiel sind die Mitglieder der TEA/ATTS DNA Bindedomäne Familie, zu denen auch der Transkriptionsfaktor Tec1 gehört, dem eine Funktion bei der Hyphenbildung zugeschrieben wird (Schweizer *et al.*, 2000).

Zum anderen handelt es sich um spezifische DNA Bindesequenzen, welche nur von einzelnen Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor Cph1 (Liu *et al.*, 1994) und der Transkriptionsrepressor Nrg1 (Murad *et al.*, 2001b). Für beide Proteine wurde ebenfalls eine Rolle bei der Hyphenausbildung gezeigt. Bei dem Transkriptionsfaktor Cap1 handelt es sich um einen basischen Leucin Zipper, dessen Funktion im Zusammenhang mit der Antwort auf oxidativen Stress und der Ausbildung von Resistenzen steht (Alarco and Raymond, 1999). Weitere, innerhalb der Promotorregion verschiedener *SAP* Gene vorhandene Bindedomänen, sind die des in der Aminosäurebiosynthese involvierten Transkriptionsfaktors Gcn4 (Tripathi *et al.*, 2002), oder der Zinkfinger Proteine Mig1 (Zaragoza *et al.*, 2000) und Rim101 (Davis *et al.*, 2000), welche an der Glucose-

Repression bzw. der Antwort auf pH Änderungen beteiligt sind. Ein Bestandteil des MAP Kinase Signaltransduktionsweges und mitverantwortlich für die Regulation der Zellintegrität ist der Transkriptionsfaktor Rlm1 (Zakrzewska *et al.*, 2005), für den ebenfalls potentielle Bindestellen gefunden wurden. Einen Einfluss auf verschiedenste Prozesse hat der generelle Transkriptionsrepressor Tup1 (Braun and Johnson, 1997), für den Bindestellen in den Promotorregionen einiger *SAP* Gene gefunden wurden. Bei Betrachtung der identifizierten putativen Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der *SAP* Promotorregionen wird deutlich, dass diese zum Teil unterschiedliche zelluläre Abläufe regulieren können. Ein großer Anteil ist jedoch an der Regulation der Morphologie beteiligt.

Die Anzahl und Lage der verschiedenen Bindestellen innerhalb der einzelnen *SAP* Promotorsequenzen variiert stark (Tab. 2). Für einige Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Gcn4, wurden innerhalb der untersuchten Promotorregionen aller *SAPs* mindestens drei bis zwölf putative DNA Bindesequenzen gefunden. Die Regulation von *SAP* Genen durch einen an der Aminosäurebiosynthese beteiligten Transkriptionsfaktor ist zumindest für *SAP2*, welches 12 putative Bindestellen im Promotorbereich besitzt und dessen Expression auf Proteinmedien als einziger Stickstoffquelle induziert wird, vorstellbar. Die Induktion von *SAP2* könnte in diesem Fall unmittelbar mit dem Stickstoffmetabolismus der Zelle coreguliert sein. Es ist jedoch auch möglich, dass die bekannte Konsensussequenz (TGANTN) des Gcn4 nicht spezifisch genug bestimmt ist. Hierzu ist anzumerken, dass alle hier aufgeführten Bindestellen lediglich potentielle Bindestellen darstellen und nur einen Hinweis auf eine mögliche Bindung liefern.

Im Gegensatz zum Gcn4 finden andere Transkriptionsfaktoren nur in bestimmten *SAP* Promotorregionen mögliche DNA Bindestellen vor. Dazu gehören unter anderem Cph1 und Tec1. Verschiedene putative Cph1 Bindestellen kommen in den Promotorregionen der Gene *SAP4* bis *SAP6*, sowie eine weitere Bindestelle im *SAP7* Promotor vor. Jeweils drei mögliche DNA Bindesequenzen von Tec1 kommen ebenfalls in den Promotorbereichen der Gene *SAP4* bis *SAP6* und darüber hinaus je eine

weitere Bindestelle innerhalb der *SAP2* und *SAP8* Promotoren vor. Beide Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation der Hyphenausbildung beteiligt, mit der auch die Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* in Zusammenhang steht.

Die beiden Zinkfinger-Proteine Mig1 und Rim101 besitzen jeweils in nur einem *SAP* Promotor eine putative DNA Bindesequenz (Mig1 in *SAP3* und Rim101 in *SAP8*). Daher handelt es sich entweder um eine sehr spezifische Regulation oder um eine nicht funktionelle Bindestelle.

Die genaue Lokalisation der putativen DNA Bindestellen der einzelnen Transkriptionsfaktoren innerhalb der verschiedenen Promotorregionen der *SAP* Gene ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2. Lokalisation der putativen Bindestellen der einzelnen Transkriptionsfaktoren innerhalb der Promotorregionen der Gene *SAP1* bis *SAP10***

Transkriptionsfaktor	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP7</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>	<i>SAP10</i>
Cap1	keine	-434 / -428	-961 / -955 -952 / -946 -449 / -443	keine	-962 / -956	-533 / -527	keine	-905 / -899	keine	-925 / -919
Cph1	keine	keine	keine	-772 / -766 -690 / -684	-972 / -966	-798 / -792 -718 / -712	-748 / -742	keine	keine	keine
Efg1	-137 / -132	-979 / -974 -292 / -287	-892 / -887 -789 / -784 -534 / -529 -492 / -487	-975 / -970 -195 / -190 -119 / -114	-865 / -860 -537 / -532 -253 / -248	-920 / -915 -802 / -797 -581 / -576 -287 / -282	-593 / -588 -338 / -335	-794 / -789 -461 / -456 -431 / -426	-866 / -861 -533 / -528 -301 / -296 -215 / -210 -62 / -57 -38 / -33	-837 / -832 -428 / -423 -335 / -330 -79 / -74 -47 / -42
Gcn4	-923 / -918 -615 / -610 -526 / -521 -393 / -388 -346 / -341	-867 / -862 -686 / -681 -641 / -636 -328 / -323 -323 / -318 -318 / -313 -313 / -308 -308 / -303 -303 / -298 -288 / -283 -88 / -83 -63 / -58	-814 / -809 -633 / -628 -323 / -318 -229 / -224 -120 / -115	-752 / -747 -646 / -641 -609 / -604 -568 / -563 -176 / -171 -110 / -105	-895 / -890 -803 / -798 -709 / -704 -672 / -667 -630 / -625	-822 / -817 -685 / -680 -607 / -602 -208 / -203	-844 / -839 -500 / -495 -221 / -216	-876 / -871 -872 / -867 -790 / -785 -391 / -386	-817 / -812 -775 / -770 -689 / -684 -663 / -358 -652 / -647 -353 / -348 -312 / -307 -81 / -76 -34 / -29	-902 / -897 -731 / -726 -653 / -648 -487 / -482 -461 / -456 -424 / -419 -267 / -262 -30 / -25

<b>Transkriptionsfaktor</b>	<b>SAP1</b>	<b>SAP2</b>	<b>SAP3</b>	<b>SAP4</b>	<b>SAP5</b>	<b>SAP6</b>	<b>SAP7</b>	<b>SAP8</b>	<b>SAP9</b>	<b>SAP10</b>
Mig1	keine	keine	-762 / -751	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine
Nrg1	-170 / -165	-969 / -964	keine	-933 / -928 -466 / -461	-286 / -281	-959 / -954	-962 / -687	-982 / -977 -643 / -638	-995 / -990	-554 / -549 -110 / -105
Rim101	keine	keine	keine	keine	keine	keine	keine	-967 / -962	keine	keine
Rlm1	-655 / -646 -426 / -417	-365 / -356	-958 / -949 -590 / -581 -446 / -437	keine	keine	keine	keine	keine	-904 / -895	keine
Tec1	keine	-919 / -914	keine	-804 / -799 -65 / -60 -44 / -39	-115 / -110 -90 / -85 -65 / -60	-830 / -825 -90 / -85 -65 / -60	keine	-181 / -176	keine	keine
Tup1	keine	-969 / -965	keine	-934 / -930 -466 / -462	keine	-959 / -955	-692 / -688	-982 / -978	keine	-101 / -97

### III.1.2. *In vitro* Analyse der Transkriptionsregulation der SAP Gene

*In silico* Analysen der SAP Promotoren ergaben eine theoretische Möglichkeit der Transkriptionsregulation dieser Gene durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wobei ein Großteil an der Regulation der Zellmorphologie beteiligt ist. Da verschiedene Mutantenstämme hergestellt wurden, denen jeweils ein entsprechender Transkriptionsfaktor fehlt, konnte der Einfluss der Transkriptionsfaktor – Deletion auf die Expression der einzelnen SAP Gene untersucht werden.

#### III.1.2.1. SAP Genexpression in Transkriptionsfaktormutanten

Mutantenstämme, denen die Transkriptionsfaktoren Cap1, Cph1, Efg1, Gcn4, Mig1, Nrg1 oder Tup1 fehlen, sind durch eine anormale Morphologie bzw. einen gestörten Dimorphismus gekennzeichnet. Zur Analyse des möglichen Einflusses dieser Transkriptionsfaktoren auf die SAP Genexpression wurden die verschiedenen Mutanten in den hypheninduzierenden Medien Serum (5% Serum in H<sub>2</sub>O) oder Lee's angezogen und im zeitlichen Verlauf entnommene Proben mittels RT-PCR untersucht. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der SAP Genexpression der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp SC5314 und relativ zu der Expression des konstitutiv exprimierten Gens *EFB1* zusammengefasst. Demnach scheinen die Transkriptionsfaktoren Cap1, Gcn4, Mig1, Nrg1 und Tup1 unter diesen *in vitro* Bedingungen keinen Einfluss auf die SAP Genexpression zu haben. Alternativ muss angenommen werden, dass ihr Ausfall und die damit verbundenen Auswirkungen durch die Expression anderer Faktoren kompensiert wird.

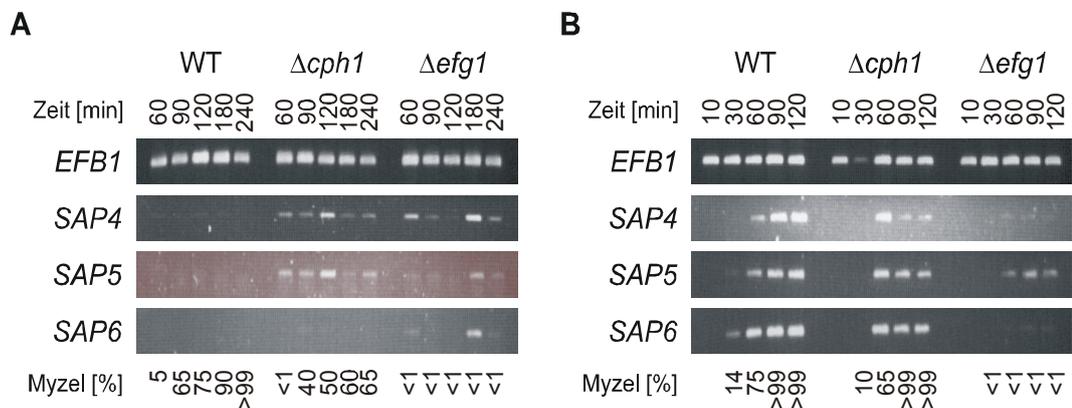
**Tabelle 3. Expression der Gene *SAP1* bis *SAP10* unter hypheninduzierenden Bedingungen in Mutanten verschiedener Transkriptionsfaktoren**

<b>Transkriptionsfaktormutante</b>	<b>SAP Genexpression während der Hypheninduktion (mittels Serum – bzw. Lee's Medium)</b>
<i>Δcap1</i>	entspricht in beiden Medien dem WT
<i>Δcph1</i>	<i>SAP4 bis SAP6</i> in Lee's Medium stärker als im WT entspricht in Serum Medium dem WT
<i>Δefg1</i>	<i>SAP4 bis SAP6</i> in Serum Medium schwächer als im WT <i>SAP4 bis SAP6</i> in Lee's Medium stärker als im WT
<i>Δgcn4</i>	entspricht in beiden Medien dem WT
<i>Δmig1</i>	entspricht in beiden Medien dem WT
<i>Δnrg1</i>	entspricht in beiden Medien dem WT
<i>Δtup1</i>	entspricht in beiden Medien dem WT

WT = Wildtyp

Im Unterschied dazu führt die Deletion der Transkriptionsfaktorgene *CPH1* und *EFG1* zu einem veränderten Expressionsniveau bestimmter *SAP* Gene. In Lee's Medium angezogene Kulturen der beiden Mutantenstämme *Δcph1* und *Δefg1* weisen eine zum Teil schwache, jedoch im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* auf (Abb. 2A). Die Hypheninduktion variiert in diesem Anzuchtmedium in Abhängigkeit von der Mutation. Die Deletion des Gens für den Transkriptionsfaktors *Efg1* führt zu einer nahezu kompletten Blockade der Myzelausbildung (zu allen Messpunkten < 1%). Die *Δcph1* Mutante zeigt diese drastischen Auswirkungen nicht, weist jedoch eine im Vergleich zum Wildtyp verzögerte Myzelbildung auf (Abb. 2A). Ein ähnliches Verhaltensmuster ist im Anzuchtmedium Serum zu beobachten. Auch hier bewirkt die *EFG1* Deletion eine fast 100%-ige Hemmung der Myzelausbildung. Eine im Gegensatz zum Lee's Medium stärkere, aber im Vergleich mit dem Wildtyp wiederum verzögerte Hypheninduktion ist bei der *Δcph1* Mutante zu beobachten (Abb. 2B). Bei der *Δefg1* Mutante bewirkt das Medium Serum eine schwache (*SAP5*) bzw. starke (*SAP4*, *SAP6*) Verringerung der Genexpression im Vergleich zum Wildtyp, bei dem die Expressionsstärke dieser Gene mit dem zeitlichen Verlauf zunimmt (Abb. 2B). Die *Δcph1* Mutante verhält sich unter diesen Anzuchtbedingungen ähnlich wie der Wildtyp. Nur die

*SAP4* Expression ist in dieser Mutante gegenüber dem Wildtyp zum Teil abgeschwächt (Abb. 2B). Beim Vergleich der *SAP4* bis *SAP6* Expression in Abhängigkeit der beiden verschiedenen hypheninduzierenden Medien wird deutlich, dass Efg1 im Wildtyp sowohl reprimierend (Lee's Medium, Abb. 2A) als auch aktivierend (Serum Medium, Abb. 2B) auf die Transkription von Genen wirken kann. Für Cph1 kann unter bestimmten Bedingungen eine Funktion als Transkriptionsrepressor postuliert werden (Lee's Medium, Abb. 2A). Aufgrund der gegensätzlichen Aussagen in Abhängigkeit des jeweiligen Anzuchtmediums ist das *in vivo* Verhalten während einer Infektion der beiden Transkriptionsfaktoren schwer voraussagbar.



**Abbildung 2. *In vitro* Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* in den Transkriptionsfaktormutanten  $\Delta cph1$  und  $\Delta efg1$  unter hypheninduzierenden Bedingungen**

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Transkriptmenge der Gene *SAP4* bis *SAP6* zu verschiedenen Zeitpunkten [min] in Mutantenstämmen, welchen die Transkriptionsfaktoren Cph1 bzw. Efg1 fehlen, im Vergleich zum Wildtyp (WT) analysiert. Als Kontrolle diente dabei das Haushaltsgen *EFB1*.

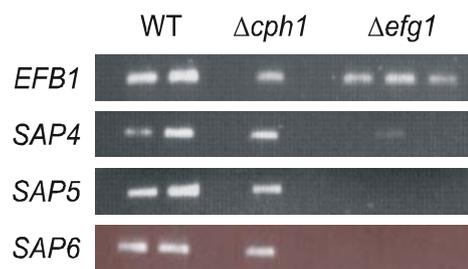
(A) Bei Anzucht in Lee's Medium war eine zum Teil erhöhte Transkriptmenge in den Mutanten nachweisbar. (B) Die Anzucht in Serum Medium führte zu keiner Veränderung ( $\Delta cph1$ ) bzw. einer Verringerung ( $\Delta efg1$ ) der Transkriptmenge. Der Anteil an Zellen mit Hyphenbildung variierte in Folge der Gendeletionen und in Abhängigkeit des gewählten Anzuchtmediums (Angabe in Prozent [%]).

### III.1.3. *In vivo* Analyse der Transkriptionsregulation der Gene **SAP4 bis SAP6**

*In silico* und *in vitro* Arbeiten sprechen für einen Einfluss der Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1 auf die Regulation der Gene *SAP4* bis *SAP6* unter hypheninduzierenden Bedingungen (siehe III.1.1 und III.1.2). Ein eindeutiger Rückschluss auf die *in vivo* Verhältnisse ist jedoch nicht möglich. Die Untersuchung von  $\Delta cph1$ - und  $\Delta efg1$ - infizierten Mäusen sollte Aufschluss über den Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren auf die *SAP4* bis *SAP6* Expression geben.

#### III.1.3.1. Efg1 ist Transkriptionsaktivator der Gene **SAP4 bis SAP6**

In einer Versuchsreihe, in der die Virulenz der Transkriptionsfaktormutanten  $\Delta cph1$  und  $\Delta efg1$  untersucht wurde, konnte RNA aus der Leber von intraperitoneal infizierten Mäusen gewonnen werden (24h nach Infektion). Ein Teil dieser RNA stand für eine RT-PCR zur Untersuchung der *SAP4* bis *SAP6* Expression zur Verfügung. Dabei handelte es sich um RNA von einer  $\Delta cph1$  -, drei  $\Delta efg1$  - und zwei Wildtyp (SC5314) - infizierten Mäusen. Das Expressionsniveau der verschiedenen *in vivo* Infektionen zeigte, dass die Deletion des *EFG1* Gens eine deutliche Verringerung der *SAP4* bis *SAP6* Transkription nach sich zieht (Abb. 3), wohingegen die  $\Delta cph1$  Mutante keine Unterschiede gegenüber dem Wildtyp SC5314 aufweist. Demnach fungiert der Transkriptionsfaktor Efg1 im Wildtyp bei der Mausinfektion als Aktivator der *SAP4* bis *SAP6* Genexpression. Diese Beobachtungen entsprechen den *in vitro* Ergebnissen bei der Anzucht mit Serum als Hypheninduktionsmedium (Abb. 2B).



### Abbildung 3. *In vivo* Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6*

Mit Hilfe einer RT-PCR wurde die Transkriptmenge der Gene *SAP4* bis *SAP6* von intraperitoneal infizierten Mäusen analysiert. Dafür stand RNA von zwei Wildtyp [WT]–, einer  $\Delta cph1$ – und drei  $\Delta efg1$ – infizierten Mäusen zur Verfügung. Die Deletion des Transkriptionsfaktors Cph1 führte zu keiner Veränderung der Transkription. Die  $\Delta efg1$  Mutante wies eine deutliche Verringerung der Transkriptmenge auf.

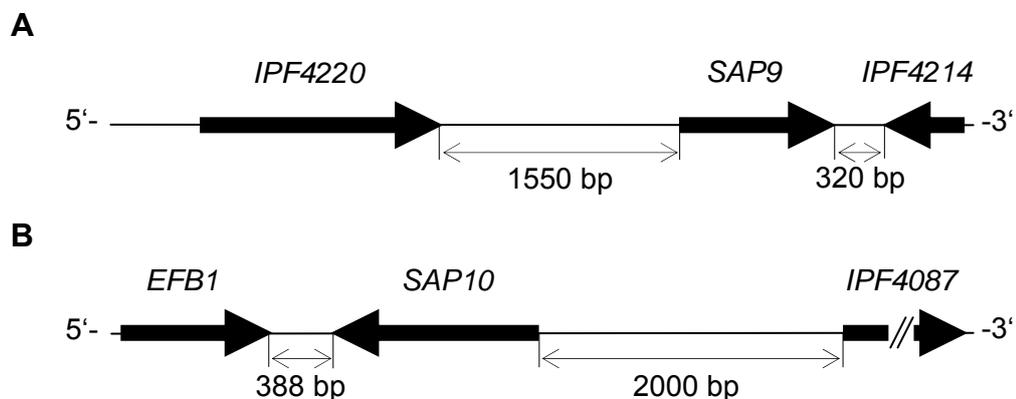
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beiden, an der Hyphenregulation beteiligten Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1 einen Einfluss auf die Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* bei *in vitro* Versuchen haben, so, wie es auf der Basis von *in silico* Analysen angenommen wurde. Diese Ergebnisse konnten für den Transkriptionsfaktor Efg1 in einem Mausmodell bestätigt werden.

### III.2. *In silico* Analyse der beiden Aspartatproteasen *SAP9* und *SAP10*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren die beiden Aspartatproteasen Sap9 und Sap10 kaum beschrieben. Innerhalb der letzten Jahre konnte jedoch die Sequenzierung und Annotation des gesamten *Candida* Genoms abgeschlossen werden. Mit Hilfe der Datenbanken *Candida* DB (*Candida* database) (d'Enfert *et al.*, 2005) und CGD (*Candida* genome database) (Arnaud *et al.*, 2005) konnten daher die Sequenzen der beiden jüngsten Familienmitglieder der sekretorischen Aspartatproteasen, *SAP9* (Monod *et al.*, 1998) und *SAP10* (Accession Number AF146440), mit denen der anderen Mitgliedern der Sap Familie auf DNA – und Protein – Ebene verglichen werden.

### III.2.1. Genomische Lokalisation der Proteasegene *SAP9* und *SAP10*

Das 1635 bp lange Gen *SAP9* befindet sich auf dem Chromosom 3, zirka 1550 bp stromabwärts des *IPF4220* (IPF = Individual Protein File), welches eine Homologie zu *PEP8*, dessen Genprodukt in *S. cerevisiae* am Proteintransport vom Endosom zum Golgi Apparat beteiligt ist, aufweist. Zirka 320 bp stromabwärts von *SAP9*, jedoch in entgegengesetzter Leserichtung befindet sich *IPF4214*, dessen Funktion noch unbekannt ist (Abb. 4A). Das *SAP10* Gen, welches 1362 bp umfasst, befindet sich auf Chromosom 4 in entgegengesetzter Leserichtung zwischen den Genen *EFB1*, das für einen Translationselongationsfaktor kodiert, und *IPF4087*, welches dem, für eine Proteinkinase kodierenden Gen *PAK1* aus *S. cerevisiae*, ähnlich ist. Die jeweilige Entfernung zu diesen Genen beträgt 388 bp bzw. 2000 bp. Eine Übersicht hierzu ist in Abbildung 4B gegeben.



**Abbildung 4. Genomische Umgebung der Gene *SAP9* und *SAP10***

(A) *SAP9*, welches auf Chromosom 3 lokalisiert ist, wird von den Genen *IPF4220* und *IPF4214* umgeben. *IPF4220* befindet sich dabei in gleicher – und *IPF4214* in entgegengesetzter Leserichtung zu dem Gen *SAP9*. (B) *SAP10* ist auf Chromosom 4 lokalisiert und wird von den Genen *EFB1* und *IPF4087*, welche sich beide in entgegengesetzter Leserichtung zu *SAP10* befinden, flankiert.

### III.2.2. Gemeinsamkeiten der Proteasen Sap9 und Sap10 mit den anderen Mitgliedern der Sap Familie

Charakteristisch für alle sekretorischen Aspartatproteasen aus *C. albicans* entsteht nach der Translation ein Präproenzym. Nach Einschleusung in das endoplasmatische Retikulum wird das Präpeptid (Signalpeptid) von der Signalpeptidase prozessiert. Die Positionierung der Prozessierungsstelle im Signalpeptid lässt sich nach den Regeln von von Heijne voraussagen (von Heijne, 1983, 1984). Das Computerprogramm SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> (Bendtsen *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 1997)), welches auf den von Heijne Regeln basiert, detektiert die Schnittstelle des Signalpeptides („/“) innerhalb der Präproproteinsequenz von Sap9 an Position 17 / 18 (Ala Leu Ala<sub>17</sub> / Ala<sub>18</sub> Lys) und innerhalb von Sap10 an Position 20 / 21 (Val Lys Cys<sub>20</sub> / Ser<sub>21</sub> Ile).

Im weiteren Verlauf gelangt das entstandene Proenzym durch Vesikeltransport in den Golgi Apparat. Dibasische Aminosäuresequenzen Lysin / Arginin oder Lysin / Lysin können als Prozessierungsstellen der im späten Golgi Apparat lokalisierten Serinprotease Kex2 fungieren, wodurch das Proenzym in den Zustand des reifen Enzyms überführt wird. In der Proenzymsequenz von Sap9 befinden sich vier mögliche Kex2 Prozessierungsstellen an den Positionen Lys Arg<sub>50</sub>, Lys Arg<sub>106</sub>, Lys Arg<sub>128</sub> und Lys Lys<sub>211</sub>. Innerhalb der Sap10 Proenzymsequenz existiert nur ein dibasisches Kex2 Erkennungsmotiv an Position Lys Arg<sub>38</sub>.

Wie alle Aspartatproteasen besitzen die Proteasen Sap9 und Sap10 konservierte Aspartatrete, welche sich im katalytischen Zentrum befinden. Aspartatrete sind innerhalb des Sap9 Proteins an den Positionen Asp<sub>83</sub> sowie Asp<sub>371</sub> und innerhalb von Sap10 an den Positionen Asp<sub>70</sub> und Asp<sub>266</sub> lokalisiert.

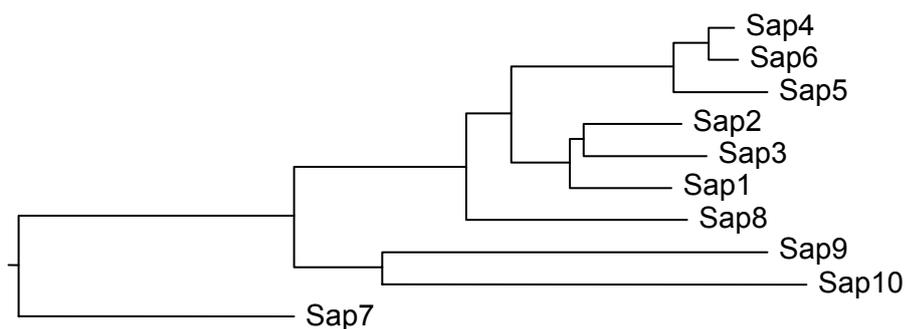
Weiterhin werden bei allen Mitgliedern der Sap Familie zwei Disulfidbrücken postuliert. Jeweils vier, zur Ausbildung der beiden Disulfidbrücken nötige Cysteinreste befinden sich in der Sap9 Proteinsequenz an den Positionen Cys<sub>98</sub> und Cys<sub>195</sub> sowie Cys<sub>406</sub> und Cys<sub>441</sub>, die Cysteinreste von Sap10 an den Positionen Cys<sub>85</sub> und Cys<sub>112</sub> sowie Cys<sub>301</sub> und Cys<sub>333</sub>. Darüber hinaus

sind in der Präproproteinsequenz von Sap10 zwei weitere Cysteinreste (Cys<sub>20</sub> und Cys<sub>433</sub>) vorhanden. Diese spielen für die Ausbildung von Disulfidbrücken wahrscheinlich keine Rolle, da sie sich außerhalb des reifen Proteins bzw. im C-terminalen, durch weitere Prozessierungen gekennzeichneten Sequenzbereich befinden (siehe III.2.3).

Mit Hilfe der Software 'Lasergene' lässt sich eine Voraussage zum theoretischen Molekulargewicht einer Proteinsequenz treffen. Die abgeleiteten Molekulargewichte der reifen Enzyme Sap9 und Sap10 betragen aufgrund der 494 Aminosäuren (AS) und 415 AS umfassenden Sequenzen zirka 53 kDa und 45 kDa.

### III.2.3. Unterschiede der Proteasen Sap9 und Sap10 zu den anderen Mitgliedern der Sap Familie

Im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Sap Familie weisen die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 eine Konsensussequenz für eine mögliche Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Verankerung auf. Darauf ist wahrscheinlich auch die Clusterbildung von Sap9 und Sap10 innerhalb eines Sap Dendrogramms zurückzuführen (Abb. 5).



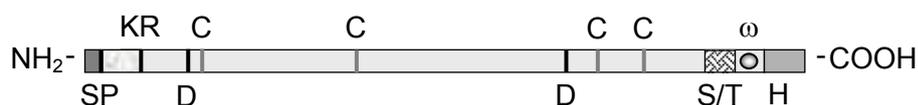
#### Abbildung 5. Dendrogramm der Proteinsequenzen Sap1 bis Sap10

Das Alignment der Proteinsequenzen der Proteasen Sap1 bis Sap10 weist die Untergruppen Sap1 bis Sap3, Sap4 bis Sap6 sowie Sap9 und Sap10 auf.

GPI verankerte Proteine enthalten in ihrer Sequenz eine so genannte Omegaposition, an welcher die Anheftung des GPI Ankers erfolgt. In N-terminaler Richtung geht der Omegaposition eine Serin / Threonin – reiche Region voraus. Ein weiteres Charakteristikum GPI verankerter Proteine ist ihr hydrophiler C- Terminus. All diese Merkmale können innerhalb der Proteinsequenzen von Sap9 und Sap10 identifiziert werden. Mit Hilfe der Software 'The GPI Fungal Prediction Server' ([http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/gpi/fungi_server.html), (Eisenhaber *et al.*, 2004)) wurden die Omegapositionen von Sap9 und Sap10 an den Stellen Ser<sub>520</sub> und Ser<sub>429</sub> bestimmt.

Aufgrund dieser Untersuchungen kann gesagt werden, dass die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 alle typischen Sequenzmerkmale der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen aufweisen. Darüber hinaus besitzen sie im Unterschied zu den anderen Mitgliedern der Sap Familie eine putative Erkennungssequenz für eine mögliche GPI Verankerung.

Zusammenfassungen der, aus den Sequenzen abgeleiteten Eigenschaften sind in Abbildung 6 und Tabelle 4 dargestellt.



#### Abbildung 6. Struktureller Aufbau der Proteasen Sap9 und Sap10

Wie alle anderen Mitglieder der Sap Familie setzen sich Sap9 und Sap10 aus einem Präproenzym zusammen. Das Präpeptid wird durch die Signalpeptidase (SP) im endoplasmatischen Retikulum prozessiert. Das entstandene Proenzym passiert auf dem sekretorischen Weg den Golgi Apparat. Die dibasischen Aminosäuren Lysin / Arginin (KR) können als Prozessierungsstellen der, im späten Golgi Apparat lokalisierten Protease Kex2 dienen, wodurch das Proenzym aktiviert wird. Im aktiven Zentrum befinden sich zwei Aspartatreste (D). Zwei Disulfidbrücken werden durch vier Cysteinreste (C) gebildet. Im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Sap Familie besitzen Sap9 und Sap10 eine Konsensussequenz für eine putative GPI Verankerung. Diese ist durch eine Serin / Threonin – reiche Region (S/T) gekennzeichnet, gefolgt von der Omegaposition ( $\omega$ ) und einem hydrophoben Bereich (H).

Tabelle 4. Charakteristika der Sequenzen der Aspartatproteasen Sap9 und Sap10

	Chromosom	DNA Sequenz	Länge / theoret. MG inkl. Präpro- enzym	Signalpeptid	potent. Kex2 Prozessier- ungsstellen	Länge / theoret. MG des reifen Enzyms	Aspartat- reste	Cystein- reste	Omega- Position
<b>Sap9</b>	3	1635 bp	544 AS 59 kDa	ALA <sub>17</sub> / A <sub>18</sub> K	KR <sub>50</sub> KR <sub>106</sub> KR <sub>128</sub> KK <sub>211</sub>	494 AS 53 kDa	D <sub>83</sub> TG D <sub>371</sub> TG	C <sub>98</sub> C <sub>195</sub> C <sub>406</sub> C <sub>441</sub>	S <sub>520</sub>
<b>Sap10</b>	4	1362 bp	453 AS 49 kDa	VKC <sub>20</sub> / S <sub>21</sub> I	KR <sub>38</sub>	415 AS 45 kDa	D <sub>70</sub> TG D <sub>266</sub> TG	C <sub>85</sub> C <sub>112</sub> C <sub>301</sub> C <sub>333</sub>	S <sub>429</sub>

MG = Molekulargewicht

### **III.3. Heterologe Expression der Proteasen Sap9 und Sap10 in *Pichia pastoris***

*In silico* Analysen sagen voraus, dass die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen eine Konsensussequenz für eine mögliche GPI Verankerung enthalten. Demnach werden Sap9 und Sap10 nicht sekretiert, sondern auf der Zelloberfläche verankert.

Erste Hinweise auf eine tatsächlich vorhandene GPI Verankerung gaben die Ergebnisse der Versuche der heterologen Expression von *SAP9* und *SAP10* in *Pichia pastoris*. Dies beruht auf den Arbeiten von M. Monod, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (Lausanne, Schweiz).

#### **III.3.1. Das *Pichia pastoris* Expressionssystem**

Der Pilz *P. pastoris* wird als eukaryontisches Expressionssystem eingesetzt. Da diese Hefe unter bestimmten Bedingungen nur sehr geringe Mengen eigener Proteine sekretiert und ein entsprechendes Anzuchtmedium nur geringe Proteinmengen enthält, können heterolog exprimierte, sekretierte Proteine direkt im Überstand nachgewiesen und aufgereinigt werden. Die eingesetzten Expressionsvektoren enthalten einen Methanol – induzierbaren Promotor, wodurch eine gezielte Genexpression erreicht werden kann. Die für die heterologe Expression von *SAP9* und *SAP10* eingesetzten Vektoren unterscheiden sich in der Länge ihrer C- terminalen Proteinsequenz.

### III.3.2. Die C-terminalen Enden mit putativen GPI Anker Konsensussequenzen verhindern die Sekretion der Proteasen Sap9 und Sap10

Bei der heterologen Expression der Proteasen *SAP9* und *SAP10* unter Verwendung des *P. pastoris* Expressionssystems variierte die nachweisbare Proteinmenge im Kulturüberstand in Abhängigkeit von der C-terminalen Länge der Proteinsequenzen. Ein vollständig vorhandener C-Terminus von Sap9 verhindert die Sekretion dieser Protease in den Kulturüberstand (0 µg/ml). Die C-terminale Deletion von 27 Aminosäuren (AS), welche einen großen Teil der GPI Anker Konsensussequenz einschließlich der Omega-Position enthält, führt zur Sekretion des Proteins (30 µg/ml). Diese Ausbeute kann durch die Deletion eines größeren Bereiches (50 AS), inklusive der Serin / Threonin – reichen Region gesteigert werden (60 µg/ml). Ein ähnliches, vom C-Terminus abhängiges Sekretionsmuster ist auch für die Protease Sap10 zu beobachten. Ein vollständiger C-Terminus, bzw. die Deletion eines geringfügigen Bereiches (11 AS) der hydrophoben Region unterbindet die Sekretion des Sap10 Proteins (0 µg/ml). Umfasst der deletierte Bereich 66 AS und somit die gesamte GPI Anker Konsensussequenz, ist die Protease im Kulturüberstand nachweisbar (40 µg/ml). Die vom C-Terminus abhängige Proteinsekretion ist in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 5. Sekretion der heterolog exprimierten Proteasen Sap9 und Sap10 in Abhängigkeit von der Länge des C-Terminus**

	Deletion des C-Terminus	Skizze des C-Terminus	Menge des Proteins im Kulturüberstand
Sap9	0 AS		0 µg / ml
	27 AS		30 µg / ml
	50 AS		60 µg / ml
Sap10	0 AS		0 µg / ml
	66 AS		40 µg / ml

AS = Aminosäuren

Die Sekretion der Proteasen Sap9 und Sap10 im *P. pastoris* Expressionssystem konnte nach Deletion von Teilbereichen der C-terminalen putativen GPI Konsensussequenz nachgewiesen werden und war bei kompletter Beseitigung dieser Sequenz am stärksten. Somit wird die Annahme einer GPI Verankerung der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 bestärkt.

### **III.4. Lokalisation der Proteasen Sap9 und Sap10**

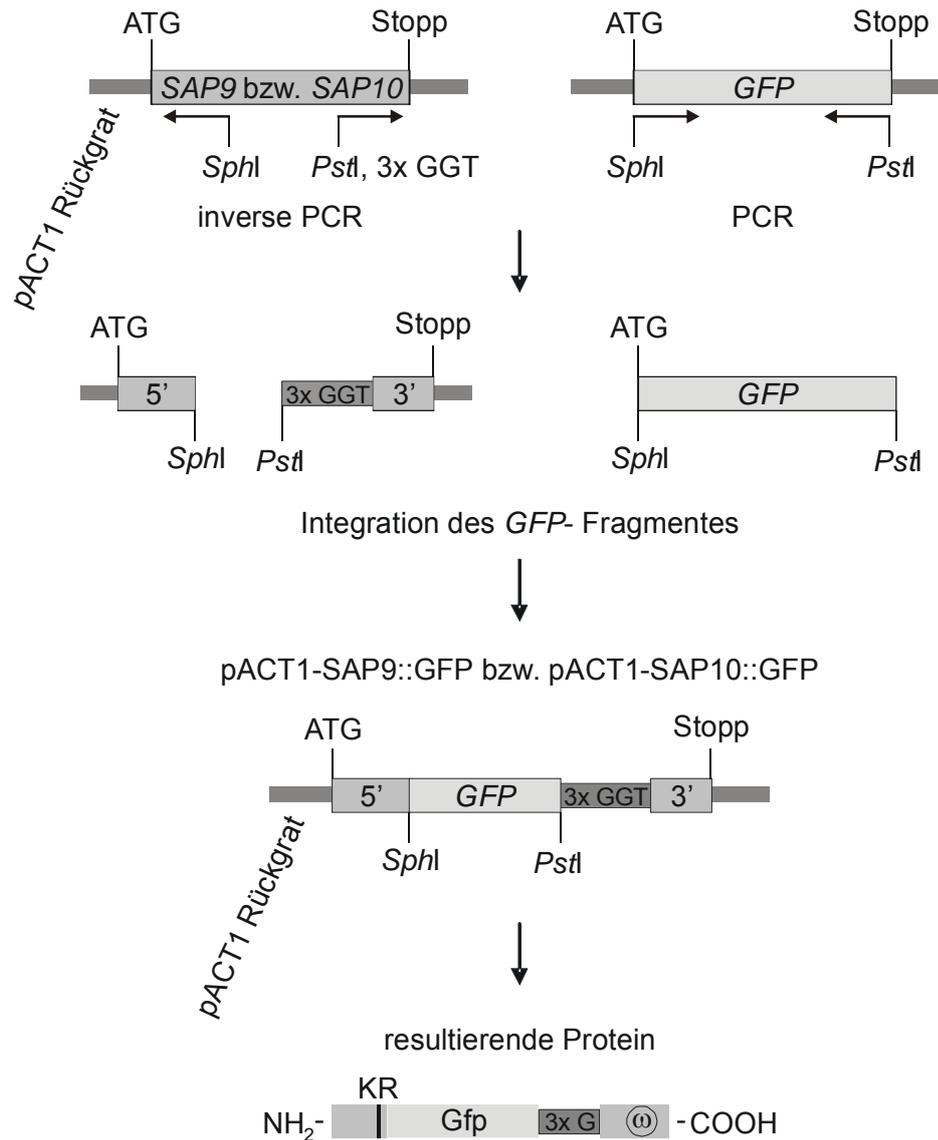
Im Unterschied zu allen anderen Mitgliedern der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen wird die Sekretion von Sap9 und Sap10 durch den C-Terminus verhindert. Dies kann auf die C-terminal gelegene Konsensussequenz für eine GPI Verankerung zurückgeführt werden. GPI Proteine können auf der Zelloberfläche durch Verankerungen in der Plasmamembran oder Zellwand lokalisiert sein. Ob die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 tatsächlich auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, sollte durch die Konstruktion und Untersuchung von Green Fluorescent Protein (Gfp) Fusionsproteinen ermittelt werden.

#### **III.4.1. Konstruktion von Gfp Fusionsproteinen**

Eine Möglichkeit der zellulären Proteinlokalisierung bietet die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein (Gfp). In Bezug auf Sap9 und Sap10 wurde das *GFP* Gen so in die *SAP9* bzw. *SAP10* Sequenzen integriert, dass nach der Translation das Gfp vier Aminosäuren hinter der mutmaßlichen Kex2 Prozessierungsstelle lokalisiert ist, und durch einen aus drei Glycin bestehenden Linker mit dem C-terminalen Bereich, 33 (Sap9) bzw. 49 (Sap10) Aminosäuren vor der Omegaposition verknüpft ist. Nach der Passage des Golgi Apparates sollte demnach ein Fusionsprotein mit

N- terminalem Gfp entstehen, welches während der weiteren Prozessierung aufgrund des mutmaßlichen GPI Ankers innerhalb der Zelloberflächenstrukturen verankert wird.

Die Konstruktion der entsprechenden Fusionsplasmide erfolgte mit Hilfe der inversen PCR Technik. Dazu wurden, unter Verwendung der Primer SAP9 inverse-fwd / SAP9 inverse-rev und SAP10 inverse-fwd / SAP10 inverse-rev die putative Kex2 Prozessierungssequenz der 5'- Region sowie die komplette, die Konsensussequenzen für die GPI Verankerung enthaltende C- terminale 3'- Region der *SAP9* und *SAP10* Sequenzen aus den Plasmiden pACT1-SAP9 und pACT1-SAP10 amplifiziert. Die dabei generierten Restriktionsenzym – Erkennungssequenzen *Pst*I und *Sph*I wurden für die Integration des mittels GFP-fwd / GFP-rev aus dem Vektor pMG1602 (Gerami-Nejad *et al.*, 2001) amplifizierten *GFP* genutzt, wodurch die *SAP::GFP* Fusionskonstrukte pACT1-SAP9::*GFP* und pACT1-SAP10::*GFP* entstanden. Für spätere Kontrollen dienten die Vektoren pACT1-GFP (Expression von *GFP* ohne Anteile von *SAP* Genen) und pGFP (*GFP* ohne Promotor). Die ebenfalls auf den Plasmidkonstrukten befindliche *RPS10* Sequenz bewirkte nach der Transformation eine Integration in das Genom des *C. albicans* Stammes CAI4 am *RPS10* Locus. Eine schematische Darstellung der *SAP::GFP* Fusionskonstrukte ist in Abbildung 7 dargestellt. Die mittels Southern Blot Technik überprüften *C. albicans* Transformationen lieferten die Stämme CAI4[*RPS10::SAP9::GFP*], CAI4[*RPS10::SAP10::GFP*] sowie die als Kontrolle dienenden Stämme CAI4[*RPS10::GFP*] und CAI4[*RPS10::GFP*<sub>woPACT1</sub>].



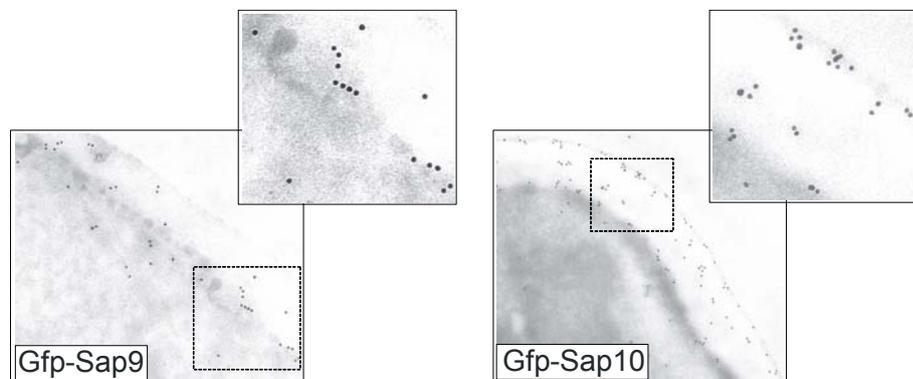
### Abbildung 7. Konstruktion von SAP – GFP – Fusionsplasmiden

Mittels inverser PCR wurden die 3'- und 5'- Bereiche der Proteasegene *SAP9* und *SAP10*, sowie das pACT1 Rückgrat aus den Plasmiden pACT1-SAP9 bzw. pACT1-SAP10 amplifiziert. Der jeweilige 5'-Bereich enthält die putative Kex2 Prozessierungssequenz und der 3'-Bereich umfasst die gesamte Konsensussequenz für die GPI Verankerung. Weiterhin wurden die Restriktionsenzym – Erkennungssequenzen *SphI* und *PstI* generiert, sowie ein aus drei Glycin (GGT) bestehender Linker, welcher dem 3'-Bereich vorangeht. Die Restriktionsenzym – Erkennungssequenzen wurden für die Integration der, durch PCR amplifizierten *GFP* Sequenz genutzt, wodurch die Fusionsplasmide pACT1-SAP9::GFP und pACT1-SAP10::GFP entstanden. Die resultierenden Proteinsequenzen umfassen das Gfp, welches der putativen Kex2 Prozessierungssequenz (KR) folgt und über einen Glycinlinker (G) mit der Konsensussequenz (inklusive Omegaposition,  $\omega$ ) für die GPI Verankerung verbunden ist.

### III.4.2. Sap9 und Sap10 sind unterschiedlich lokalisiert

Die Detektion der Fluoreszenz des Gfp Proteins erfolgt bei einer Wellenlänge von 480 nm. Durch mikroskopische Untersuchungen der Protease – Gfp – Fusionsstämme CAI4[*RPS10::SAP9::GFP*] und CAI4[*RPS10::SAP10::GFP*] konnten jedoch keine Fluoreszenzen nachweisen werden.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Lokalisation von GFP Fusionsproteinen ist der Einsatz eines Anti – Gfp Antikörpers, welcher unter Umständen auch nicht korrekt gefaltete Gfp Proteine erkennt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, welche in Zusammenarbeit mit M. Schaller, Universität Tübingen unter Verwendung eines goldmarkierten Anti – Gfp Antikörpers angefertigt wurden, zeigten deutlich, dass die Proteasen Sap9 und Sap10 innerhalb der Zelloberfläche lokalisiert sind (Abb. 8). Dabei ist eine unterschiedliche Verteilung der beiden Proteasen zu erkennen. Das Sap9 – Gfp – Fusionsprotein befindet sich vorrangig in der Plasmamembran, wohingegen das Sap10 – Gfp – Fusionsprotein auch in der Zellwand nachzuweisen ist (Abb. 8).



#### Abbildung 8. Lokalisation der Sap – Gfp – Fusionsproteine

Durch Immuno – Elektronenmikroskopie und Verwendung eines goldmarkierten Anti – Gfp Antikörpers wurde die Lokalisation der Protease – Gfp – Fusionsproteine analysiert und eine unterschiedliche Verteilung beobachtet. Das Sap9 – Gfp – Fusionsprotein befindet sich vorrangig in der Plasmamembran, wohingegen das Sap10 – Gfp – Fusionsprotein auch in der Zellwand nachzuweisen ist.

Diese Daten zeigen eindeutig, dass die Proteasen Sap9 und Sap10 innerhalb der Zellmembran bzw. der Zellwand lokalisiert sind, und dass die C-terminalen Sequenzen mit den GPI Anker Konsensussequenzen für diese Lokalisation verantwortlich sind.

### **III.5. Größe und Untereinheiten der Proteasen Sap9 und Sap10**

Das Laufverhalten von Proteinen in der SDS Polyacrylamidgel – Elektrophorese (PAGE) lässt Rückschlüsse auf einige ihrer Eigenschaften zu. Auf diese Weise lässt sich zum Beispiel die Größe eines Proteins abschätzen.

#### **III.5.1. Untersuchung des Laufverhaltens der heterolog exprimierten Proteine Sap9 und Sap10 in einer SDS PAGE**

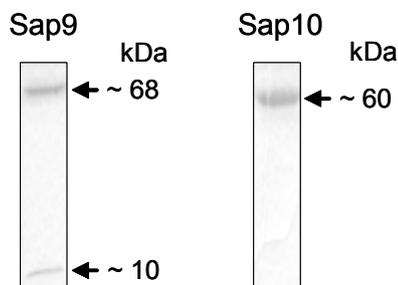
Die durch heterologe Expression in *P. pastoris* gewonnenen Proteasen Sap9 und Sap10 sind durch eine C-terminale Deletion von 27 bzw. 66 AS gekennzeichnet, da andernfalls die Sekretion der Proteine durch eine GPI Verankerung verhindert wird (siehe III.3.2). Das theoretische Molekulargewicht der entsprechenden Aminosäuresequenz des jeweiligen reifen Proteins beträgt im Falle von Sap9 50 kDa und für Sap10 38 kDa (eingesetzte Software: 'Lasergene'). Betrachtet man das Laufverhalten dieser beiden Proteine in einem denaturierenden SDS Polyacrylamidgel (Abb. 9), so lässt sich für Sap9 feststellen, dass es aus zwei Untereinheiten besteht. Diese werden in der nativen Anordnung des Proteins möglicherweise durch Disulfidbrücken zusammengehalten, welche unter den denaturierenden Bedingungen des Proteingels aufgebrochen werden.

Zwei Untereinheiten des Sap9 Proteins wurden auch von einer weiteren Arbeitsgruppe beschrieben, welche die Bezeichnungen der  $\alpha$  Untereinheit für

den N- terminalen Bereich und  $\beta$  Untereinheit für den C- terminalen Bereich vorschlug (Cawley *et al.*, 2003). In den weiteren Beschreibungen wird diese Nomenklatur übernommen.

Die Größen der Untereinheiten von zirka 10 kDa ( $\alpha$  Untereinheit) und zirka 68 kDa ( $\beta$  Untereinheit) ergeben eine Gesamtgröße von zirka 78 kDa. Diese ist deutlich höher als das vorausgesagte Molekulargewicht von 50 kDa. Ähnliches ist für Sap10 zutreffend, bei dem mit zirka 60 kDa ebenfalls das theoretische Molekulargewicht von 38 kDa deutlich überschritten wird. Eine solche Differenz kann möglicherweise durch co- oder posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosylierungen der beiden Proteasen, hervorgerufen werden.

Das Laufverhalten der Proteasen Sap9 und Sap10 in einer denaturierenden SDS PAGE spricht daher für eine Differenzierung des Sap9 Proteins in zwei Untereinheiten. Darüber hinaus sind Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosylierungen der beiden Proteine wahrscheinlich.



**Abbildung 9. SDS PAGE der heterolog exprimierten Proteine Sap9 und Sap10**

Analyse des Laufverhaltens der Proteasen in einem 12,5 % igen, denaturierenden Proteingel. Sap9 besteht aus zwei Untereinheiten von etwa 10 und 68 kDa. Sap10 weist eine Bande von etwa 60 kDa auf.

### **III.6. Glykosylierungen der Proteasen Sap9 und Sap10**

Glykosylierungen können für Proteine von verschiedener Bedeutung sein. So kann zum Beispiel die räumliche Struktur und somit auch die Funktionalität eines Enzyms von entsprechenden Glykosylierungen abhängen. Proteine können durch Glykosylierungen auch einen gewissen Schutz erhalten, wenn sie beispielsweise an der Zelloberfläche lokalisiert und dem Umweltmilieu und Proteasen ausgesetzt sind.

Es werden zwei verschiedene Formen der Glykosylierung unterschieden, die co – oder posttranslational stattfinden können. Mögliche N- glykosidische Bindestellen sind Asparaginreste, die Teil der für die Glykosylierung notwendigen Erkennungssequenz Asn-Xaa-Thr oder Asn-Xaa-Ser sind (wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure steht). Die Verknüpfung des Kohlenhydrats erfolgt hierbei am Stickstoffatom der Amidgruppe des Asparagins. Bei der O- Glykosylierung findet die Bindung am Sauerstoffatom der Seitenketten des Serins oder Threonins statt. Eine Konsensus – oder Erkennungssequenz für eine mögliche O- Glykosylierung ist nicht bekannt, wodurch die Voraussage potentieller O- Glykosylierungsstellen erschwert und sehr ungenau ist.

#### **III.6.1. Potentielle N- Glykosylierungsstellen von Sap9 und Sap10**

Auf Grundlage der Aminosäuresequenzen lassen sich potentielle N- glykosidische Verknüpfungsstellen voraussagen. Für Sap9 ergeben sich dadurch fünf mögliche Bindestellen, wobei es sich viermal um die Erkennungssequenz Asn-Xaa-Thr (Thr<sub>214</sub>, Thr<sub>242</sub>, Thr<sub>254</sub>, Thr<sub>424</sub>) und einmal um Asn-Xaa-Ser (Ser<sub>501</sub>) handelt. Innerhalb der Sap10 Sequenz tritt die Konsensussequenz Asn-Xaa-Thr fünf Mal (Thr<sub>117</sub>, Thr<sub>213</sub>, Thr<sub>247</sub>, Thr<sub>289</sub>, Thr<sub>426</sub>) und Asn-Xaa-Ser drei Mal (Ser<sub>130</sub>, Ser<sub>170</sub>, Ser<sub>210</sub>) auf, wodurch insgesamt acht potentielle N- Glykosylierungsstellen vorhanden sind.

Ein Vergleich mit den restlichen sekretorischen Aspartatproteasen Sap1 bis Sap8 zeigt, dass Sap9 und Sap10 deutlich mehr potentielle N- glykosidische Bindestellen besitzen. Eine Übersicht der möglichen N- Glykosylierungsstellen innerhalb der Sap Familie bietet Tabelle 6.

**Tabelle 6. Potentielle N- Glykosylierungsstellen innerhalb der Sequenzen des Präpropeptides (in Klammern) und des reifen Proteins der Proteasen Sap1 bis Sap10**

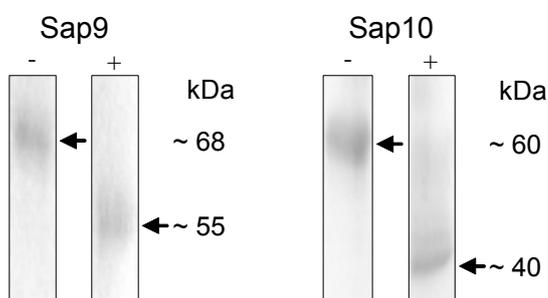
	reifes Protein (Präpropeptid)		gesamt
	Asn-Xaa-Thr	Asn-Xaa-Ser	
Sap1	0 (1)	0	0 (1)
Sap2	0	2	2 (0)
Sap3	0 (1)	1 (1)	1 (2)
Sap4	0	1	1 (0)
Sap5	0	0	0 (0)
Sap6	0	1	1 (0)
Sap7	6	0 (1)	6 (1)
Sap8	0 (1)	0	0 (1)
Sap9	4	1	5 (0)
Sap10	5	3	8 (0)

### III.6.2. Nachweis der N- Glykosylierung

Sequenzbezogene Voraussagen bezüglich der Glykosylierungen von Proteinen lassen sich durch eine Glykosidasebehandlung überprüfen. Die N- Glykosidase F spaltet alle Formen der N- Glukankette von Glykopeptiden und ermöglicht so den Nachweis von N- glykosidischen Bindungen.

Bei der Inkubation der in *P. pastoris* heterolog exprimierten Proteasen Sap9 und Sap10 mit der N- Glykosidase F werden vorhandene N- glykosidische Bindungen aufgespalten, wodurch sich auch das Laufverhalten dieser Proteine im SDS Gel verändert. Beim Vergleich Glykosidase – behandelter Proteasen mit den entsprechenden Kontrollansätzen ohne Glykosidasezugabe, ist eine deutliche Verschiebung in der SDS PAGE zu beobachten (Abb. 10). Die Verlagerung der Proteinbanden beträgt bei Sap9 ( $\beta$ - Untereinheit) zirka 13 kDa, von 68 kDa auf 55 kDa, und bei Sap10 zirka 20 kDa, von 60 kDa auf 40 kDa.

Unter Berücksichtigung der C- terminalen Deletion (27 AS bei Sap9 und 66 AS bei Sap10) zur heterologen Expression der beiden Proteasen ergibt sich ein theoretisches Molekulargewicht für Sap9 ( $\beta$ - Untereinheit) und Sap10 von jeweils 38 kDa. Stellt man die Daten des theoretischen Molekulargewichts denen der SDS PAGE gegenüber so sind besonders im Falle von Sap9 weitere Modifikationen, beispielsweise durch O- Glykolsylierung vorstellbar.



**Abbildung 10. Nachweis der N- Glykosylierung der Proteasen Sap9 und Sap10**

Laufverhalten der heterolog exprimierten Proteasen nach einer Inkubation ohne (-) und mit (+) N- Glykosidase F. Für Sap9 und Sap10 ist nach Inkubation mit der N- Glykosidase F eine deutliche Verschiebung der Proteinbanden zu beobachten, wodurch eine N- Glykosylierung nachgewiesen wurde.

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der Sap Familie weisen die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 eine deutlich stärkere N- Glykosylierung auf. Eine ebenfalls vorhandene O- Glykosylierung ist möglich.

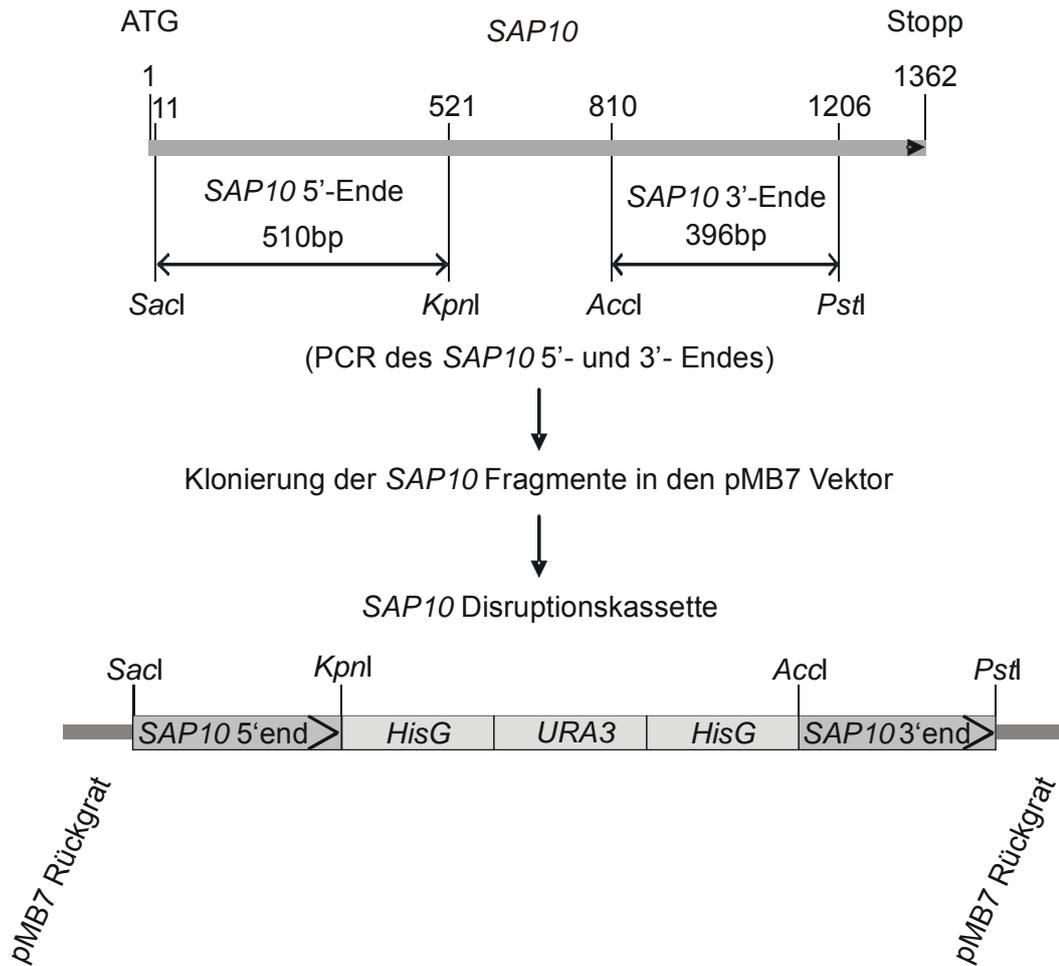
### **III.7. Herstellung von Einzel – und Doppelmutanten der Proteasegene *SAP9* und *SAP10***

Bei der Analyse von Genen und deren Genprodukten mit unbekannter Funktion werden nach Möglichkeit die entsprechenden Mutanten in die Untersuchungen mit einbezogen. Phänotypen dieser Mutanten können erste Hinweise auf mögliche Funktionsbereiche der betreffenden Gene bzw. Genprodukte geben.

#### **III.7.1. Konstruktion des *SAP10* Disruptionsplasmides**

Die Erzeugung einer  $\Delta sap10$  Mutante und einer, auf Grundlage dieser Mutante beruhenden  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Doppelmutante erfolgte nach der Ura - Blaster Methode (Fonzi and Irwin, 1993). Für die Konstruktion des *SAP10* Disruptionsplasmides wurde die *hisG-URA3-hisG* Kasette des pMB7 (Fonzi and Irwin, 1993) mit 3'- und 5'- Bereichen des *SAP10* Gens flankiert. Mit Hilfe der PCR Technik, unter Verwendung der Primer *SAP10fwdSac* / *SAP10revKpn* konnte, bei gleichzeitiger Generierung von Schnittstellen der Restriktionsenzyme *SacI* und *KpnI*, die 3'- Region des *SAP10* Gens von Position +11 bis +521 amplifiziert werden. Die den Bereich +804 bis +1206 umfassende 5'- Region wurde mit den Primern *SAP10fwdAcc* / *SAP10revPst* unter Generierung von *AccI* und *PstI* Schnittstellen amplifiziert. Die so erhaltenen PCR Fragmente wurden jeweils in den Topo TA Cloning Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert und als p*SAP10-3'* bzw. p*SAP10-5'* bezeichnet. Die, den 3'- Bereich des *SAP10*

Gens flankierenden und in der MCS (Multi Cloning Site) des pMB7 vorhandenen Schnittstellen des *SacI* und *KpnI* wurden für die anschließende Ligation des *SAP10* 3'- Fragmentes in den pMB7 Vektor genutzt und das resultierende Plasmid als pMB7-SAP10-3' bezeichnet. Entsprechend wurde das *SAP10* 5'- Fragment unter Verwendung der *AccI* und *PstI* Schnittstellen mit dem pMB7-SAP10-3' ligiert. Der so entstandene *SAP10* Disruptionsvektor wird als pAA10ura bezeichnet. Die Überprüfung der korrekten Klonierung der einzelnen Zwischenschritte und des pAA10ura erfolgte durch Restriktionsanalysen bzw. Sequenzierungen. Einen schematischen Überblick zur Konstruktion des *SAP10* Disruptionsplasmides bietet Abbildung 11. Für die Erzeugung der  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Doppelmutante stand der *SAP9* Disruptionsvektor pAF9ura bereits zur Verfügung (A. Felk, 2002 Doktorarbeit).



### Abbildung 11. Konstruktion des SAP10 Disruptionsplasmides pAA10ura

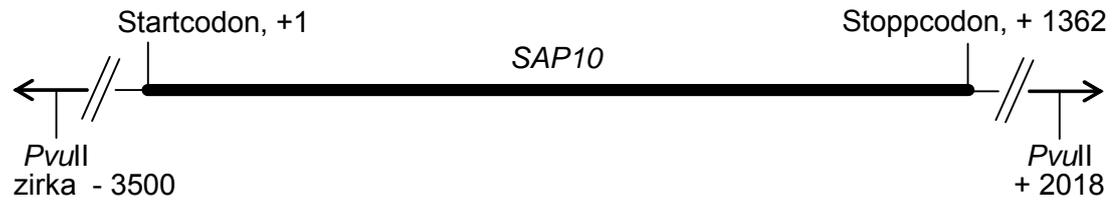
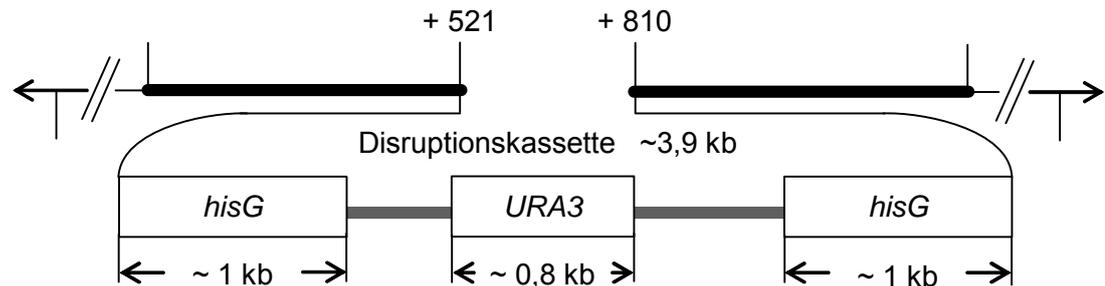
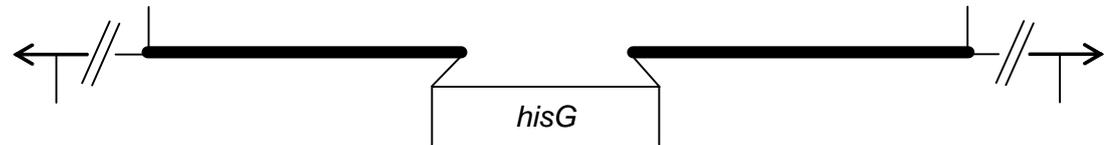
Für die Konstruktion des SAP10 Disruptionsplasmides wurde die *hisG-URA3-hisG* Kassette des Vektors pMB7 mit 3'- und 5'- Sequenzen des SAP10 Gens flankiert. Bei der Amplifikation der 3'- und 5'- Sequenzen mittels PCR wurden Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Accl* und *PstI* bzw. *Sacl* und *KpnI* generiert und für die Integration in den Vektor pMB7 genutzt, wodurch das SAP10 Disruptionsplasmid pAA10ura entstand.

### III.7.2. Generierung der Transformantenstämme

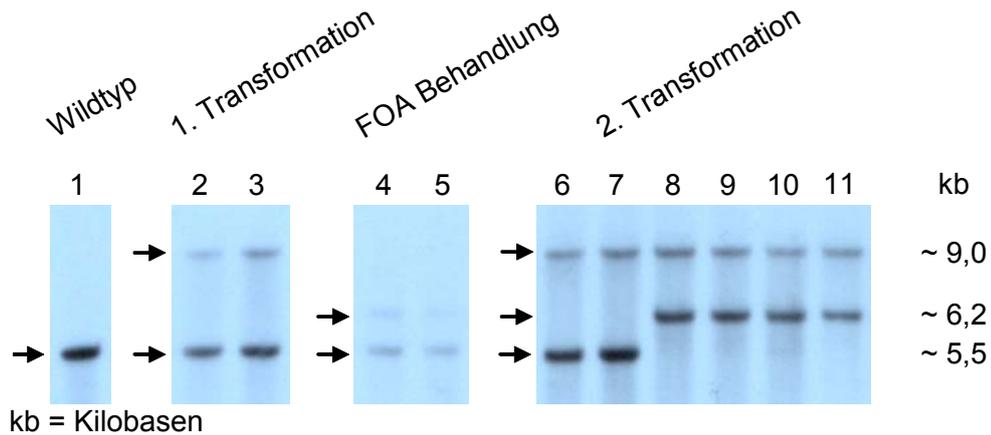
Die Gen Disruption in dem diploiden Organismus *C. albicans* bedingt das Ausschalten beider Allele des entsprechenden Gens. Eine homozygote Mutante kann demnach durch zwei Runden der Ura – Blaster Methode (Fonzi and Irwin, 1993) erzeugt werden.

Zur Konstruktion einer  $\Delta sap10$  Mutante wurde das *SAP10* Disruptionsplasmid pAA10ura in den *URA3* negativen Stamm CAI4 transformiert. Mit Hilfe des Selektionsmarkers *URA3* konnten positive Transformanten selektiert werden. Durch eine nachfolgende 5-FOA (5-Fluoro – Orotic – Acid) Behandlung wurde die *URA3* negative, heterozygote Mutante generiert, aus der in einer erneuten Transformation mit pAA10ura die homozygote Mutante  $\Delta sap10$  entstand (Abb. 12).

Zur Herstellung der  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  Doppelmutante wurde das *SAP9* Disruptionsplasmid pAF9ura in die 5-FOA – behandelte und somit *URA3* negative  $\Delta sap10$  Mutante transformiert. Wiederum wurde der *URA3* Selektionsmarker zur Identifizierung positiver Transformanten genutzt. Die 5-FOA Behandlung der heterozygoten Mutante mit nachfolgender Transformation des pAF9ura führte zur homozygoten  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  Doppelmutante. Für Untersuchungen wurden zwei zeitgleich hergestellte isogene Transformanten ( $\Delta sap9 / \Delta sap10_A$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10_B$ ) verwendet. Die Kontrolle der Mutantenstämme, inklusive der einzelnen Zwischenschritte erfolgte durch PCR – und Southern Blot Technik (Einzelmutante  $\Delta sap10$  Abb. 13).

WildtypTransformationFOA Behandlung**Abbildung 12. Herstellung der  $\Delta sap10$  Einzelmutante**

Die Herstellung der  $\Delta sap10$  Einzelmutante erfolgte mit Hilfe der Ura – Blaster Methode. Das *SAP10* Disruptionsplasmid pAA10ura wurde in den *URA3* negativen Stamm CA14 transformiert und positive Transformanten mit Hilfe des Selektionsmarkers *URA3* selektiert. Durch eine nachfolgende 5-FOA (5-Fluoro – Orotic – Acid) Behandlung wurde die *URA3* negative, heterozygote Mutante generiert, aus der in einer erneuten Transformation mit pAA10ura die homozygote Mutante  $\Delta sap10$  entstand. Die Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym *PvuII*, welche sich außerhalb der *SAP10* Sequenz befinden, wurden für die Southern Blot Analyse der Mutante eingesetzt (Abb. 13).



### Abbildung 13 Southern Blot Analyse der $\Delta sap10$ Einzelmutante

Die verschiedenen Stämme, welche während der Herstellung der  $\Delta sap10$  Mutante entstanden (siehe auch Abb. 12) wurden mit Hilfe der Southern Blot Technik überprüft. Genomische DNA der zu untersuchenden Stämme wurde mit dem Restriktionsenzym *PvuII* inkubiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Eine Sonde, welche mit Sequenzbereichen des *SAP10* Gens identisch ist markierte den *SAP10* Locus, wodurch Änderungen innerhalb dieses Bereiches sichtbar wurden. Die *PvuII* Fragmente der *SAP10* Allele des Wildtyps (Spur 1) besitzen eine Größe von zirka 5,5 kb. Die Integration der zirka 3,9 kb großen Disruptionskassette, im Austausch gegen 0,3 kb der *SAP10* Sequenz führte zu einer Größenzunahme des entsprechenden Allelfragmentes. Positive Klone der 1. Transformation (Spur 2 und 3) weisen neben der 5,5 kb Bande des unveränderten Allels eine Bande von zirka 9,0 kb auf. Die FOA Behandlung führte zur Selektion von Klonen, welche in Folge einer Rekombination nur noch das *hisG* Fragment der Disruptionskassette enthalten. Die Bande des entsprechenden Allelfragmentes besitzt eine Größe von zirka 6,2 kb. Eine erneute Transformation führte bei Integration in das unveränderte *SAP10* Allel, neben der *hisG* – enthaltenden, 6,2 kb großen Bande, wiederum zu einer Bande von zirka 9,0 kb (Spur 8 bis 11). Erfolgte die Integration in das *hisG* – enthaltenden Allel (Spur 6 und 7), so ergab sich das selbe Bandenmuster wie bei der 1. Transformation und ein unverändertes *SAP10* Allel blieb erhalten.

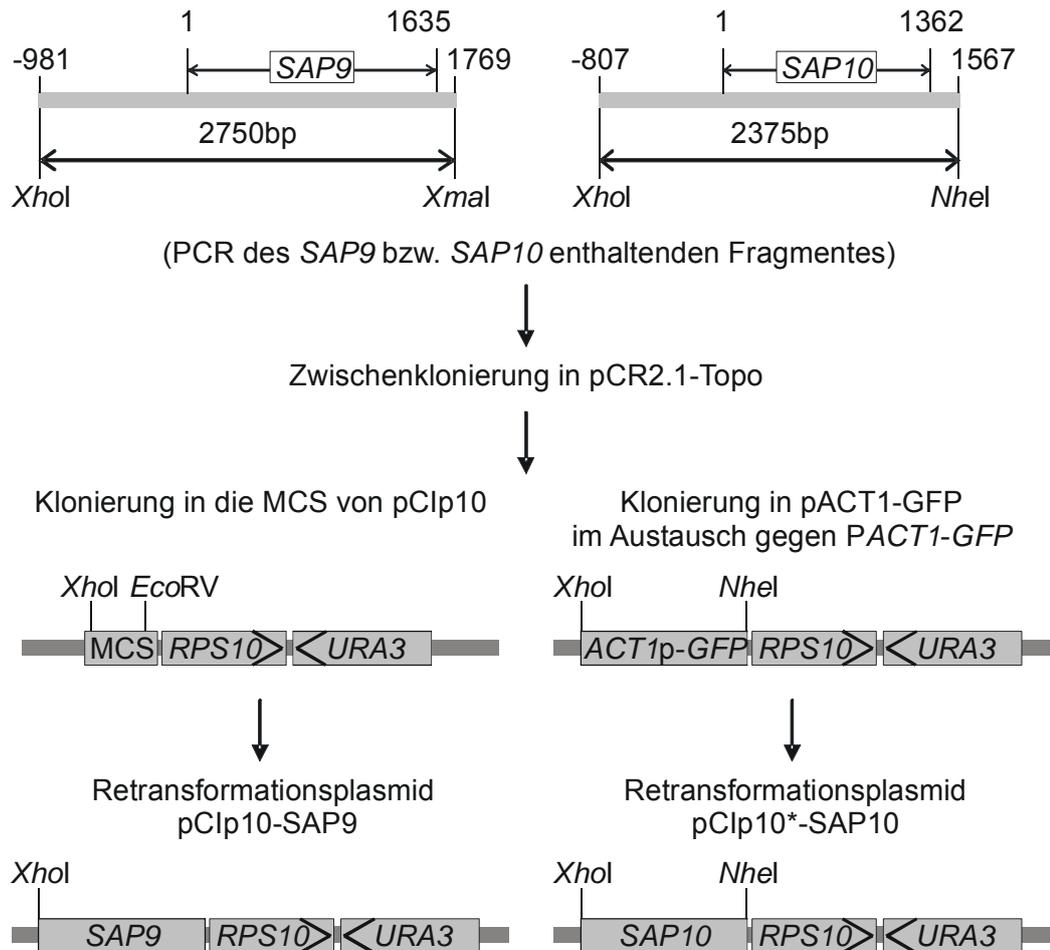
## III.8. Herstellung der Retransformantenstämme

Phänotypen einer Mutante können zweifellos auf den „Knock out“ des entsprechenden Gens zurückgeführt werden, wenn die Reintegration dieses Gens in die jeweilige Mutante den beobachteten Phänotyp aufheben kann („Molekularen Kochschen Postulate“ (Falkow, 1988)). Dabei befindet sich das Gen im Genom der Retransformante nicht zwingend am Originalloкус.

### III.8.1. Konstruktion der Retransformationsplasmide und – Stämme

Die Retransformanten der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  wurden durch Integration der Gene *SAP9* bzw. *SAP10* in den *RPS10* Locus mit Hilfe des *URA3* Selektionsmarkers erzeugt. Das Rückgrat für die entsprechenden Retransformationsplasmide waren der pClp10 und der pACT1-GFP Vektor, welche neben dem *URA3* Gen auch die *RPS10* Sequenz enthalten.

Die Sequenzbereiche von *SAP9* und *SAP10* umfassten die Promotorregionen, die offenen Leserahmen und 134 bp (*SAP9*) bzw. 205 bp (*SAP10*) des nicht translatierten 3'-Bereichs und wurden mit Hilfe der Primer *SAP9* fwd13 / *SAP9* rev13 (*SAP9* -981 bis +1769) und *SAP10* fwd6 / *SAP10* rev3 (*SAP10* -807 bis +1567) unter Generierung der Restriktionsschnittstellen *Xho*I / *Xma*I (*SAP9*) und *Xho*I / *Nhe*I (*SAP10*) amplifiziert und in den Topo TA Cloning Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert, wodurch die Vektoren pCR2.1-TOPO-*SAP9*<sub>Re</sub> bzw. pCR2.1-TOPO-*SAP10*<sub>Re</sub> entstanden. Zur Konstruktion des *SAP9* Retransformationsplasmides wurde das *Xho*I / *Xma*I Fragment des pCR2.1-TOPO-*SAP9*<sub>Re</sub> Vektors in die Schnittstellen *Xho*I / *Eco*RV des pClp10 ligiert und als pClp10-*SAP9* bezeichnet. Das *Xho*I / *Nhe*I *SAP10* Fragment wurde aus pCR2.1-TOPO-*SAP10*<sub>Re</sub> freigesetzt und im Austausch gegen das *Xho*I / *Nhe*I *PACT1-GFP* Fragment in den Vektor pACT1-GFP integriert, und das daraus resultierende Plasmid als pClp10\*-*SAP10* bezeichnet. Eine schematische Darstellung der Konstruktion der genannten Plasmide bietet Abbildung 14.



#### Abbildung 14. Konstruktion der Retransformationsplasmide pClp10-SAP9 und pClp10\*-SAP10

Zur Konstruktion der Retransformationsplasmide wurden mittels PCR amplifizierte Sequenzen, welche den Promotorbereich, die Proteasegenesequenz und mindestens 130 bp stromabwärts des Stoppcodons umfassen in die Vektoren pClp10 bzw. pACT1-GFP integriert. Diese Vektoren enthalten den Selektionsmarker *URA3* und die *RPS10* Sequenz für eine Integration in den *RPS10* Locus während der Transformation. Die PCR Produkte wurden in den Vektor pCR2.1-Topo kloniert. Während der PCR generierte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *XmaI* bzw. *XhoI* und *NheI* wurden für die Integration der Protease – enthaltenden Sequenzen in die Vektoren pClp10 bzw. pACT1-GFP genutzt. Bei der Integration der *SAP9* – enthaltenden Sequenz in den Vektor pClp10 gingen die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *XmaI* und *EcoRV* in Folge der „blunt end“ Ligation verloren. Die Integration der *SAP10* – enthaltenden Sequenz erfolgte im Austausch gegen das *XhoI* / *NheI* PACT1-GFP Fragment des Vektors pACT1-GFP. Die resultierenden Plasmide wurden als pClp10-SAP9 und pClp10\*-SAP10 bezeichnet.

Die Plasmide pClp10-SAP9 und pClp10\*-SAP10 wurden durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse überprüft. Bei den Mutantenstämmen  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  wurde durch 5-FOA Behandlung das jeweilige *URA3* Markergen entfernt. Somit konnten die Plasmide nach Linearisierung in den *RPS10* Locus der Ura – negativen Mutantenstämme  $\Delta sap9$  bzw.  $\Delta sap10$  integriert werden. Um einen entsprechenden Kontrollstamm herzustellen wurde der Ura – negative Wildtypstamm CAI4 mit dem leeren pClp10 Plasmid transformiert. Die Kontrolle der durchgeführten Transformationen erfolgte mit Hilfe der Southern Blot Technik.

### **III.9. Phänotypscreen der Protease – Mutantenstämme**

Für die Untersuchung von Mutanten mit noch unbekanntem Phänotyp eignen sich Screening – Methoden mit denen eine möglichst hohe Anzahl von physiologischen, zellulären, mikrobiologischen und biochemischen Eigenschaften getestet werden können. Ein Beispiel hierfür ist der Platten – Tropftest, bei dem die zu untersuchenden Stämme auf verschiedenen Medien mit definierten Zellzahlen ausgetropft werden und so das Wachstum im Vergleich zum parental Stamm beobachtet werden kann. Hierbei erfasste Phänotypen geben erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der entsprechenden Gene und ermöglichen so ein gezieltes weiteres Vorgehen.

#### **III.9.1. Medienauswahl für den Phänotypscreen**

Im Tropftest Screen eingesetzte Medien wurden nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt. Für die Analyse der  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Einzelmutanten sowie der  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Doppelmutante wurde zum einen das Wachstum dieser Stämme auf Grundlage verschiedener Kohlenstoffquellen untersucht. Dazu wurde Glukose, eine von *C. albicans* gut

verwertbare Kohlenstoffquelle, gegen Galaktose, Glycerol und Mannitol ausgetauscht. Da das Wachstum und die Morphologie von *C. albicans* durch den pH beeinflusst wird, wurde weiterhin der pH Wert des SD (synthetic defined) Mediums innerhalb der Bereiche pH 4 bis 8 variiert. Bestimmte Medien haben darüber hinaus einen Einfluss auf die Morphologie. So induzieren Lee's –, Serum – oder Spider Medium das Hyphenwachstum und wurden daher mit in die Untersuchungen einbezogen.

Eine weitere Möglichkeit, um Aussagen über die Eigenschaften von Mutanten, und damit die Funktion des ausgeschalteten Gens zu erhalten, ist die Untersuchung des Wachstumsverhaltens nach Zusatz von Antimykotika. Diese können in verschiedene Gruppen mit unterschiedlichen Wirkungsspektren eingeteilt werden. Einige der Wirkstoffe haben sehr spezifische Angriffspunkte, wie zum Beispiel die Chitinsynthese im Falle des Nikkomyzin Z. Andere Antimykotika haben eher breite Ansatzpunkte und hemmen zum Beispiel die Proteinbiosynthese. Eine höhere Sensibilität oder Resistenz gegenüber diesen Wirkstoffen lässt Schlussfolgerungen über die Eigenschaften von Mutanten zu. Für den Tropftest Screen wurden daher folgende Wirkstoffe eingesetzt (Angriffspunkte in Klammern): Gentamycin und Hygromycin B (Proteinsynthese), Amphotericin B (Bindung an Ergosterol), Amorolfin und Itraconazol (Ergosterolsynthese), Caspofungin (Glukansynthese) und Nikkomyzin Z (Chitinsynthese).

Es ist bekannt, dass *C. albicans* BSA (Bovine Serum Albumin) als alleinige Stickstoffquelle nutzen kann, dafür aber extrazelluläre proteolytische Aktivität, vor allem die Sap2 Protease, benötigt. Demzufolge kann die  $\Delta sap2$  Mutante auf solchen Medien kaum wachsen (Hube *et al.*, 1997). Zur Untersuchung einer möglichen Funktion der Proteasen Sap9 und / oder Sap10 bei der extrazellulären Aktivität (zum Beispiel durch Prozessierung von Sap2), sollte das Wachstumsverhalten der  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Einzelmutanten sowie der  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Doppelmutante auf BSA enthaltenden Medien analysiert werden.

Weitere, auf verschiedene Art und Weise Stress hervorrufende Konditionen oder Medienzusätze wurden ebenfalls für die Untersuchungen der Mutanten

angewandt. Dazu gehörten der Zusatz verschiedener Salzkonzentrationen in das Medium, anaerobe Anzuchtbedingungen oder der Zusatz von Chemikalien, welche die Zelloberfläche modulieren, wie zum Beispiel Calcofluor, Congo Red, Ethanol und SDS.

Neben den Medieninhaltsstoffen hat auch die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum. Aus diesem Grunde wurde das Verhalten der Mutantenstämme bei unterschiedlichen Temperaturen beobachtet.

Eine Übersicht aller getesteten Medien ist in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7. Anzuchtbedingungen bzw. Medienzusätze, welche für die Analyse der Proteasemutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  mittels Tropftest eingesetzt wurden**

Kohlenstoffquellen	Glukose, Galaktose, Glycerol, Mannitol
pH Wert des SD Mediums	4, 6, 7, 8
Anzuchttemperatur	18°C, 30°C, 37°C, 45°C
Salzzugabe	CaCl <sub>2</sub> , NaCl
anaerobe Bedingungen	5% CO <sub>2</sub> - Brutschrank
Hyphen – induzierende Medien	Lee's, Serum, Spider
Antimykotika	Amorolfin, Amphotericin B, Caspofungin, Gentamycin, Hygromycin B, Itraconazol, Nikkomycin Z
weitere Stressfaktoren	Calcofluor, CongoRed, Ethanol, SDS
Protein als einzige Stickstoffquelle	BSA

### III.9.2. Sap9 und Sap10 sind für die Integrität der Zelloberfläche von Bedeutung

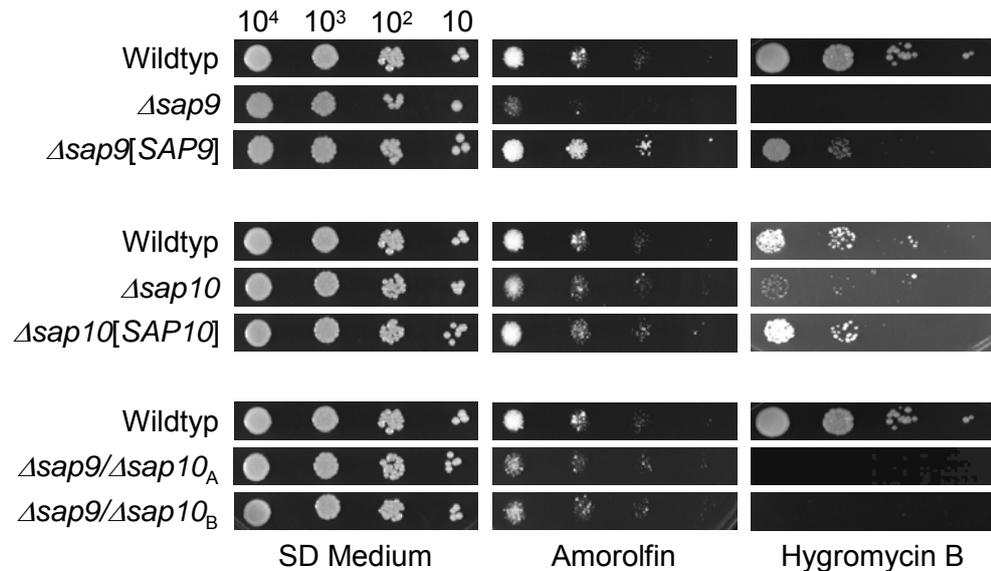
Um erste Anzeichen der funktionellen Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 zu erhalten, wurden das Wachstumsverhalten der Einzelmutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$ , sowie der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  im Vergleich zum Wildtyp und den entsprechenden Retransformanten  $\Delta sap9[SAP9]$  und  $\Delta sap10[SAP10]$  untersucht.

Bei Wachstum auf Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Galaktose, Glycerol, Mannitol) waren keine Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp zu erkennen. Das Ausbleiben markanter Phänotypen auf diesen Medien schließt daher eine maßgebliche Rolle von Sap9 und Sap10 für die Aufnahme bzw. Verwertung von Kohlenstoff – enthaltenden Nährstoffen aus. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die beiden Proteasen an diesen Prozessen beteiligt sind, der Ausfall jedoch durch andere Proteine vollständig kompensiert wird. Ähnliches gilt für alle getesteten hypheninduzierenden Medien (Lee's, Serum, Spider), dem Medium mit BSA als einzige Stickstoffquelle sowie dem Gentamycin enthaltenden Medium, auf denen ebenfalls kein Unterschied im Wachstum gegenüber dem Wildtyp zu beobachten war. Auch die Zugabe von NaCl oder  $CaCl_2$ , die Variation des pH Wertes (pH 4 bis pH 8) oder der Temperatur (18°C bis 45°C), sowie die Anzucht unter anaeroben Bedingungen bewirkten keinen sichtbaren Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp.

Die Antimykotika Itraconazol und Amorolfin, welche die Ergosterolsynthese blockieren bzw. mit den Enzymen dieses Syntheseweges interferieren, bewirken dagegen einen deutlichen Phänotyp der Wachstumsinderung bei den Einzelmutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  als auch bei der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  gegenüber dem Wildtyp (Amorolfin, Abb. 15). Ein weiteres Antimykotikum, das Hygromycin B, welches die Proteinsynthese inhibiert, bewirkt ebenfalls eine signifikante Beeinträchtigung des Wachstums aller Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15). Sowohl Calcofluor als auch

CongoRed, zwei an die Zellwand bindende Farbstoffe, führten ebenso zu den beschriebenen Phänotypen.

Sehr schwache, nicht eindeutige Phänotypen in Form geringfügiger, zum Teil schwankender Wachstumsminderung der Mutanten waren auf den SDS oder Ethanol enthaltenden Medien zu beobachten.



**Abbildung 15. Tropftest Screen der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$**

Zu untersuchende Stämme wurden in mehreren Verdünnungsstufen (10 bis  $10^4$  Zellen) auf verschiedene Medien aufgetropft und in ihrem Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp verglichen. Als Kontrolle des gleichmäßigen Wachstums auf nicht selektivem Medium diente das SD Medium.

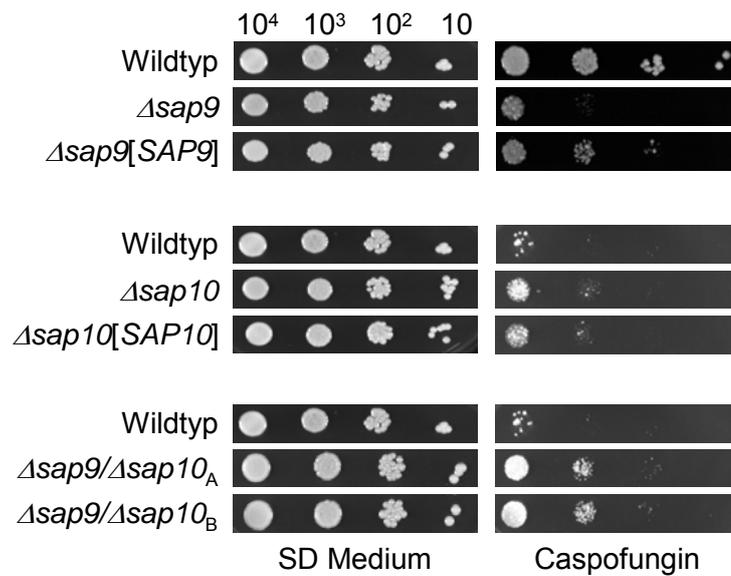
Die Hypersensitivität der Mutantenstämme ( $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$ , isogene Stämme  $\Delta sap9 / \Delta sap10_A$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10_B$ ) gegenüber Amorolfin ( $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) und Hygromycin B (für die Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$   $800 \mu\text{g} / \text{ml}$ , für die Mutante  $\Delta sap10$   $1100 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) wurde durch die Retransformantenstämme ( $\Delta sap9[SAP9]$ ,  $\Delta sap10[SAP10]$ ) aufgehoben und das Wachstum glich dem Niveau des Wildtyps.

Ein „additiver“ Phänotyp der Doppelmutante, bei dem das Wachstumsverhalten der Einzelmutanten noch weiter verstärkt wurde, war in den meisten beschriebenen Medien nicht zu beobachten. Eine Ausnahme stellte das Medium mit Hygromycin B dar. In diesem Medium war nach drei bis fünf Tagen ein stark verzögertes Wachstum der Einzelmutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  gegenüber dem Wildtyp zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte bei der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  auch nach zwei Wochen keinerlei Wachstum beobachtet werden. Somit konnte von einem „additiven“ Effekt der Mutationen ausgegangen werden.

Als einzige der bisher erwähnten Chemikalien, bewirkte Nikkomycin Z als Inhibitor der Chitinsynthese nur in Stämmen mit einer Deletion von *SAP9* eine Verschlechterung des Wachstums. Dagegen hatte dieser Wirkstoff keine sichtbaren Auswirkungen auf das Wachstum der  $\Delta sap10$  Mutante.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Medien, bei denen eine Hemmung des Wachstums erkennbar war, verursachte das Antimykotikum Caspofungin (ein Inhibitor der  $\beta$ -1,3-D – Glukansynthase) einen deutlichen Wachstumsvorteil der Einzelmutante  $\Delta sap10$  und der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  gegenüber dem Wildtyp (Abb. 16). Die  $\Delta sap9$  Einzelmutante zeigte unter diesen Bedingungen wiederum eine Verringerung des Wachstums gegenüber dem Wildtyp (Abb. 16).

Die, in allen Untersuchungen einbezogenen Retransformantenstämme  $\Delta sap9[SAP9]$  und  $\Delta sap10[SAP10]$  zeigten eine Aufhebung der Mutantenphänotypen, die jedoch in den meisten Medien nicht vollständig war (Abb. 15 und Abb. 16). Dies liegt wahrscheinlich in einem Gen – Dosis – Effekt und der Integration des Gens an einem nicht natürlichen Lokus begründet.



**Abbildung 16. Wachstumsverhalten der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  auf Caspofungin – enthaltendem Medium**

Zu untersuchende Stämme wurden in mehreren Verdünnungsstufen (10 bis  $10^4$  Zellen) auf Caspofungin – enthaltendem Medium (für die Mutante  $\Delta sap9$  120  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , für die Mutante  $\Delta sap10$  und die isogene Stämme  $\Delta sap9 / \Delta sap10_A$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10_B$  200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) aufgetropft und in ihrem Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp verglichen. Als Kontrolle des gleichmäßigen Wachstums auf nicht selektivem Medium diente das SD Medium.

Die Mutante  $\Delta sap9$  wies eine Hypersensitivität gegenüber Caspofungin auf, wohingegen die Mutanten  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  eine höhere Resistenz aufwiesen als der Wildtyp. Die Phänotypen der Mutantenstämme wurden durch die Retransformantenstämme ( $\Delta sap9[SAP9]$ ,  $\Delta sap10[SAP10]$ ) aufgehoben und das Wachstum ähnelte dem Niveau des Wildtyps.

Alle Phänotyp – hervorrufenden Medien sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8. Medienzusätze, welche bei der Analyse der Proteasemutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  mittels Tropftest zu Phänotypen geführt haben, sowie deren Auswirkungen auf die Zelle**

Substanz		Auswirkungen
Antimykotika	Amorolfin	Interferenz mit den Enzymen der Ergosterol - Synthese
	Amphotericin B	Bindung an Ergosterol der Zellmembran
	Caspofungin	Hemmung der $\beta$ -(1,3-)D-Glukan Synthase
	Hygromycin B	Inhibition der Proteinsynthese
	Itraconazol	Blockierung die Ergosterol- Synthese
	Nikkomycin Z	Störung der Zellwandbildung durch Hemmung der Chitin - Synthase
andere Stressfaktoren	Calcofluor	Zellwand - bindender Farbstoff
	CongoRed	Zellwand - bindender Farbstoff
	Ethanol	Einfluss auf die Zelloberfläche aufgrund der lipophilen Eigenschaften
	SDS	Denaturierung von Proteine, Angriff der Zelloberfläche

Es wird deutlich, dass alle Medien, die das Wachstum der Mutanten beeinflussen, einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Integrität der Zelloberfläche ausüben. Aufgrund der zum großen Teil übereinstimmenden Phänotypen der einzelnen Mutanten ( $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$ ) sind ähnliche oder auch überlappende Funktionen der Proteasen Sap9 und Sap10 möglich. Allerdings zeigen die klaren Unterschiede auf den Medien mit Nikkomycin Z oder Caspofungin, dass Unterschiede in der Funktion oder Lokalisation zwischen den beiden Proteasen bestehen könnten.

Diese Beobachtungen und aufgeführten Phänotypen der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  deuten auf eine Funktion der Proteasen Sap9 und Sap10 innerhalb der Zellwandintegrität hin, wobei überlappende Funktionsbereiche nicht ausgeschlossen sind.

### **III.10. Zellwandzusammensetzung der $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ Einzelmutanten**

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen sprechen für eine funktionelle Rolle der beiden Aspartatproteasen Sap9 und Sap10 bei der Erhaltung der Zelloberflächenintegrität. Mutanten, bei denen die Gene *SAP9* und *SAP10* ausgeschaltet wurden, zeigten ein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtypstamm bei Anwesenheit von Substanzen, welche die Zelloberfläche beeinflussen (siehe III.9). Dies ließ vermuten, dass die Zusammensetzung von Strukturen der Zelloberfläche in den Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  verändert vorliegt.

#### **III.10.1. Erhöhter Proteingehalt in der Zellwand der $\Delta sap10$ Mutante**

Der Aufbau der Zellwand beruht auf Vernetzungen von  $\beta$ 1,3- und  $\beta$ 1,6-Glukanen, Chitin und verschiedenen, mit diesem Gerüst verbundenen Proteinen. Die meisten Zellwandproteine werden bei NaOH Behandlung freigesetzt und können so zum Beispiel mit dem BCA (Bicinchonininsäure) Test quantifiziert werden.

Zur Untersuchung des Proteingehalts der Zellwand wurden die Stämme SC5314 (Wildtypstamm), CAI4::Clp (Kontrollstamm mit Leerplasmid) sowie die Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  herangezogen. Bei dem Vergleich dieser Stämme wird deutlich, dass der Proteingehalt der Zellwand der  $\Delta sap10$  Mutante (prozentualer Proteinanteil der Gesamtmasse der Zellwand:  $7,5\% \pm 0,6$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $5,8\% \pm 0,7$ ) signifikant ( $p = 0,05$ ) anstieg. Der prozentuale Anteil der Proteine in der Zellwand der  $\Delta sap9$  Mutante ( $5,6\% \pm 1,0$ ) verändert sich hingegen nicht und entsprach dem Wert des Wildtyps. Der Stamm CAI4::Clp ( $5,8\% \pm 0,6$ ) wies erwartungsgemäß eine dem Wildtypstamm entsprechende Proteinmenge auf. Alle Werte sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

### III.10.2. Erhöhter Chitingehalt in der Zellwand der $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ Einzelmutante

Chitin ist ein essentieller Bestandteil des Grundgerüsts der Zellwand. Die Zellwände der unter III.10.1 beschriebenen Stämme wurden nach der Proteinbestimmung zusätzlich auf ihren Chitingehalt hin untersucht. Der angewandte Chitinassay beruht auf der Hydrolyse des Chitins in seine N-Acetylglucosamin Bausteine, welche mittels p-Dimethylaminobenz-Aldehyd quantifiziert wurden. Die in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Deletion von *SAP9* als auch die des *SAP10* Gens zu einer Änderung des Chitingehalts innerhalb der Zellwand führte. Im Vergleich zum Wert des Stammes SC5314 (prozentualer Chitinanteil der Gesamtmasse der Zellwand:  $1,9\% \pm 0,5$ ) bzw. des CAI4::Clp ( $1,8\% \pm 0,6$ ) war der Chitinanteil in den Mutanten  $\Delta sap9$  ( $4,0\% \pm 0,9$ ) und  $\Delta sap10$  ( $3,4\% \pm 0,7$ ) signifikant ( $p = 0,05$ ) erhöht.

Diese Daten verdeutlichen, dass die Deletion der Proteasegene *SAP9* und *SAP10* eine Erhöhung des Chitingehalts innerhalb der Zellwand bewirkt. In der  $\Delta sap10$  Mutante steigt zudem auch der Proteingehalt der Zellwand an. Diese quantitative Veränderung der Zellwandzusammensetzung könnte auf eine fehlende direkte oder indirekte Regulation von Proteinen, die an der Zellwandzusammensetzung beteiligt sind, durch Sap9 und Sap10 und der damit verbundenen Überproduktion des Chitins bzw. der Proteine der Zellwand zurückgeführt werden. Es ist weiterhin möglich, dass diese Erhöhung eine Folge von kompensatorischen Vorgängen ist. In diesem Szenario werden durch die vermehrte Einlagerung von bestimmten Strukturelementen die durch die Deletion von *SAP9* und *SAP10* hervorgerufenen Verluste anderer Strukturelemente ausgeglichen.

**Tabelle 9. Protein – und Chitingehalt der Zellwand der Proteasemutanten**

	prozentualer Anteil innerhalb der Zellwand	
	Protein	Chitin
Wildtyp	5,8% ± 0,7	1,9% ± 0,5
CAI-4::Clp	5,8% ± 0,6	1,8% ± 0,6
$\Delta sap9$	5,6% ± 1,0	4,0% ± 0,9 *
$\Delta sap10$	7,5% ± 0,6 *	3,4% ± 0,7 *

\* statistisch signifikanter Unterschied zum Wildtyp,  $p < 0,05$

### III.11. Sprossungsverhalten der Mutanten $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$

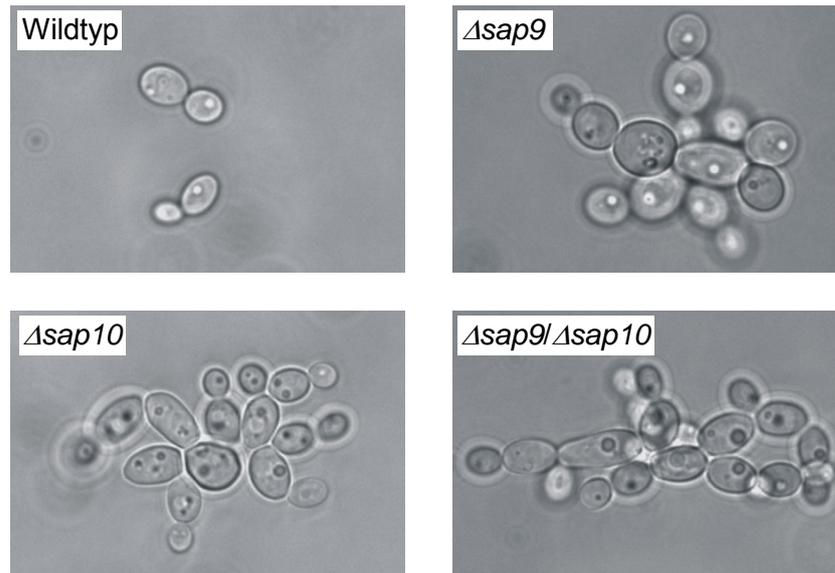
Die Hefeform von *C. albicans* vermehrt sich durch bipolare Sprossung („Budding“), wobei die Trennung von Mutter – und Tochterzelle von verschiedenen Parametern beeinflusst oder gesteuert wird. So steht polarisiertes Wachstum im Zusammenhang mit sekretorischen Vesikeln, welche Zellwand- oder Zellmembranbausteine und biosynthetische Enzyme wie zum Beispiel die Chitin – oder  $\beta$ -1,3 – Glukansynthase zur Plasmamembran transportieren. Der zeitlich als auch stofflich genaue Aufbau der Zelloberfläche spielt eine entscheidende Rolle während der Vermehrung. Da die Zellwand der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  eine veränderte Zusammensetzung mit erhöhtem Chitingehalt hatte, wurde das Verhalten der Mutanten während der Sprossung beobachtet.

#### III.11.1. Fehlfunktion der Mutanten $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ bei der Trennung von Mutter – und Tochterzelle

Für die Untersuchungen des Sprossungsverhaltens der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  im Vergleich zum Wildtyp SC5314 bzw. dem Stamm CAI4::Clp wurden alle Stämme in Flüssigkultur bis zur mittleren Log Phase angezogen.

Um das Sprossungsverhalten unter dem Mikroskop verfolgen und quantifizieren zu können, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer betrachtet. Hierbei erfolgte eine Einteilung der *Candida* Zellen in zwei verschiedene Gruppen: (1) Zellen, die einzeln oder in Aggregaten von maximal drei Zellen auftraten. (2) Zellen, die in Aggregaten von mehr als drei Zellen vorkamen.

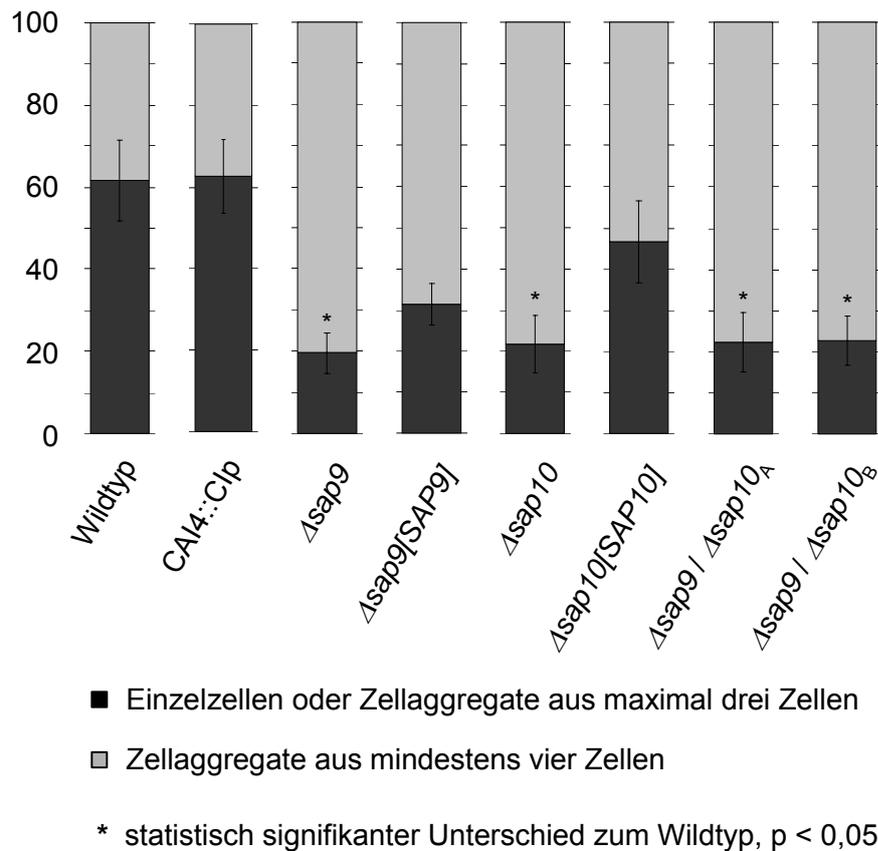
Typische Erscheinungsformen der untersuchten Stämme  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  im Vergleich zum Wildtyp sind in Abbildung 17 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion der Gene *SAP9* oder *I* und *SAP10* zu einem Trennungsdefekt während der Sprossung führte. Der Wildtyp SC5314 lag zum größten Teil in Form von Einzelzellen oder kleinen Aggregaten von maximal drei Zellen vor (prozentualer Anteil der Gesamtzellmenge:  $62\% \pm 10$ ). Ein ähnliches Bild ergab sich für den Stamm CAI4::Clp ( $63\% \pm 9$ ). In den Einzel- und den beiden isogenen Doppelmutanten sank dieser Anteil auf bis zu 22% ab, und die Hefen lagen hauptsächlich in großen Aggregaten von mindestens vier Zellen vor ( $\Delta sap9$   $80\% \pm 5$ ,  $\Delta sap10$   $78\% \pm 7$ ,  $\Delta sap9/\Delta sap10_A$   $78\% \pm 7$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10_B$   $77\% \pm 6$ ). Die Werte, der in großen Aggregaten vorliegenden Zellen sanken in den Retransformanten  $\Delta sap9[SAP9]$  ( $68\% \pm 5$ ) und  $\Delta sap10[SAP10]$  ( $53\% \pm 10$ ) im Vergleich zu den Mutanten ab, erreichten jedoch nicht das Wildtypniveau.



**Abbildung 17. Sprossungsverhalten der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$**

Die Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* führte zu einer Fehlfunktion bei der Trennung von Mutter- und Tochterzelle während der Vermehrung durch Sprossung. Im Vergleich zum Wildtyp, welcher vorrangig in einzelnen Mutter-Tochterzellkomplexen auftrat, kam es in den Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  verstärkt zur Ausbildung von Zellaggregaten.

Die quantitative Auswertung ist im Balkendiagramm (Abb. 18) veranschaulicht, welches auch die Signifikanz der beschriebenen Beobachtung aufzeigt.



**Abbildung 18. Signifikante Unterschiede im Sprossungsverhalten der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  gegenüber dem Wildtyp**

Die statistische Auswertung zeigt, dass die Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und die isogenen Stämme  $\Delta sap9/\Delta sap10_A$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10_B$  gegenüber dem Wildtyp SC5314 bzw. dem wildtypähnlichen Stamm CAI4::Clp signifikant häufiger in Zellaggregaten (bestehend aus vier oder mehr Zellen) auftraten. Die Retransformantenstämme  $\Delta sap9[SAP9]$  und  $\Delta sap10[SAP10]$  näherten sich dem Niveau des Wildtyps an.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die fehlende Aktivität der Proteine Sap9 und Sap10 eine Fehlfunktion der Trennung von Mutter – und Tochterzelle während der Sprossung nach sich zieht. Es ist möglich, dass dies im direkten oder indirekten Zusammenhang mit der veränderten Zellwandzusammensetzung steht.

### **III.12. Untersuchungen der Mutanten $\Delta sap9$ , $\Delta sap10$ und $\Delta sap9 / \Delta sap10$ mit Hilfe der Elektronenmikroskopie**

In den vorangegangenen Experimenten konnte eine veränderte Zellwandzusammensetzung und eine möglicherweise damit in direktem Zusammenhang stehende Fehlfunktion der Trennung von Mutter- und Tochterzelle während der Sprossung beobachtet werden (siehe III.11).

Die Transmissions – Elektronenmikroskopie (TEM) bietet die Möglichkeit der detaillierten Strukturabbildung in dünnen Probeschichten. In Zusammenarbeit mit Gudrun Holland und Dr. Muhsin Özel, Robert Koch Institut, Berlin, konnten TEM Aufnahmen der Mutantenstämme  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  mit denen des Wildtyps SC5314 bzw. des CAF2-1 verglichen werden. Im Mittelpunkt der Betrachtungen sollte dabei die Zellwand stehen.

#### **III.12.1. Strukturelle Veränderungen der Zellwand in den Mutanten $\Delta sap9$ , $\Delta sap10$ und $\Delta sap9/\Delta sap10$**

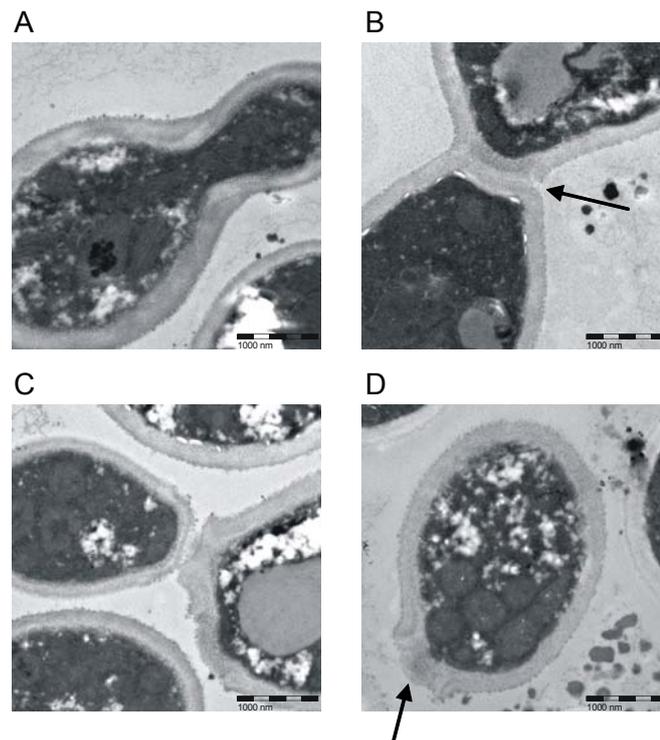
Für die TEM Aufnahmen wurden alle zu untersuchenden Stämme 48 Stunden auf YPD Festmedium angezogen und Einzelkolonien entsprechend den Bedingungen der Transmissions – Elektronenmikroskopie eingesetzt.

Bei dem Vergleich des Wildtyps SC5314 mit dem Stamm CAF2-1 (Fonzi and Irwin, 1993), welcher durch die Deletion eines der beiden *URA3* Allele gekennzeichnet ist, und somit dem *URA3* Status der Mutanten entspricht, wurde deutlich, dass keine sichtbaren Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen bestehen. Für den Vergleich mit den Mutanten wurden daher Aufnahmen beider Stämme verwendet.

In Abbildung 19 sind TEM Aufnahmen der Stämme SC5314 und CAF2-1 dargestellt, auf denen die morphologischen Veränderungen während der Sprossung zu beobachten sind. Dabei wird deutlich, dass die Zellwand

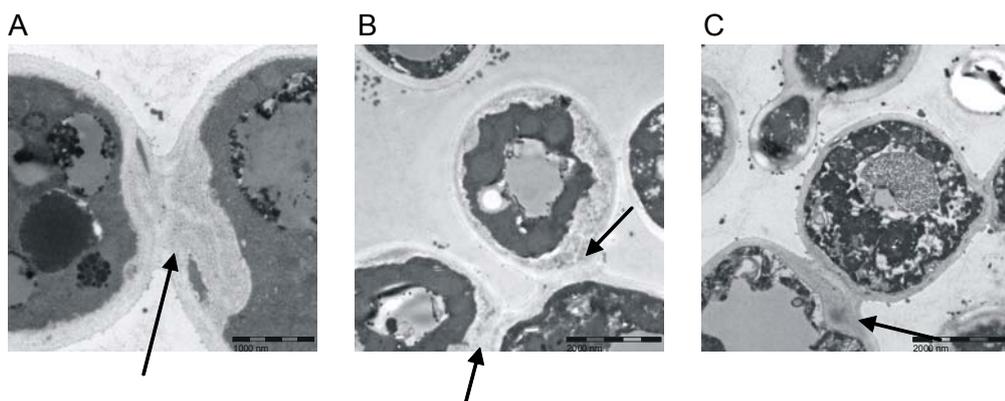
strukturelle Umwandlungen im Verlauf der Sprossung (Abb. 19A), Abschnürung und Trennung von Mutter – und Tochterzelle (Abb. 19B und Abb. 19C) durchläuft. Auch die zurückbleibende Geburtsnarbe ist aufgrund der Umorganisation der Zellwand klar erkennbar (Abb. 19D).

Die Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* bewirkte eine vom Wildtyp abweichende Änderung der Zellwandstruktur in der Sprossungszone (Bereich zwischen Mutter – und Tochterzelle). Sowohl für die Einzelmutanten  $\Delta sap9$  (Abb. 20A) und  $\Delta sap10$  (Abb. 20B), als auch für die Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  (Abb. 20C) konnte eine ungleichmäßige Verdickung der Sprossungszone dokumentiert werden. Weiterhin wurde deutlich, dass im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 19B) in den Mutanten keine klare Trennungslinie in der Sprossungszone erkennbar war. Dies ist mit der bereits beschriebenen Beobachtung der Fehlfunktion der Trennung von Mutter – und Tochterzelle konform (siehe III.11).



**Abbildung 19. Vermehrung von *C. albicans* durch Sprossung**

Aufnahmen der Transmissions – Elektronenmikroskopie zeigen den Ablauf der Trennung von Mutter – und Tochterzelle bei der Sprossung. Strukturelle Änderungen der Zellwand im Verlauf der Sprossung (A), Abschnürung (B) und Trennung (C) von Mutter – und Tochterzelle hinterlassen eine deutlich erkennbare Geburtsnarbe (D) bei der Mutterzelle.



**Abbildung 20. Strukturelle Veränderungen der Sprossungszone in den Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$**

Die Sprossungszone (Bereich zwischen Mutter – und Tochterzelle) weist sowohl in den Einzelmутanten  $\Delta sap9$  (A) und  $\Delta sap10$  (B), als auch in der Doppelmutante  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  (C) ungleichmäßige Verdickungen auf. Weiterhin ist im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 19B) keine klare Trennungslinie in der Sprossungszone erkennbar.

Insgesamt lässt sich mit Hilfe der TEM Aufnahmen der Mutantenstämme  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  eine vom Wildtyp abweichende Zellwandmorphologie innerhalb der Sprossungszone nachweisen. Dies kann in unmittelbarem Zusammenhang mit den quantitativen Veränderungen der Zellwand und der Fehlfunktion der Trennung von Mutter – und Tochterzellen stehen.

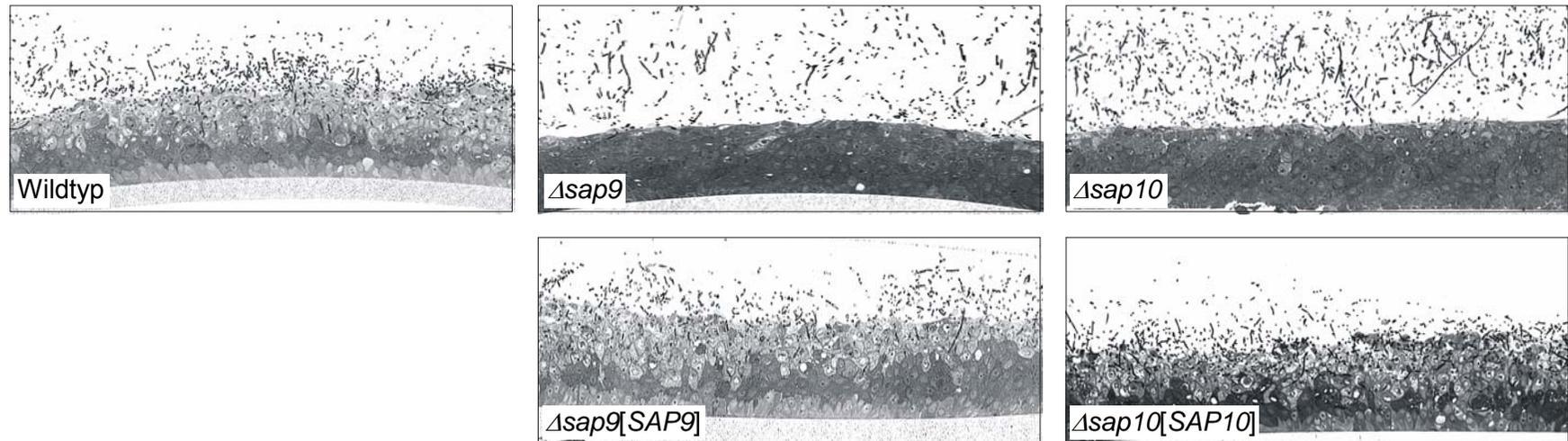
### **III.13. Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 während oraler Oberflächeninfektionen**

Der Ort des ersten Kontakts zwischen *C. albicans* und dem Wirt stellt in den überwiegenden Fällen die Schleimhaut dar. Auf ihr kann der Pilz als Bestandteil der Mikroflora persistieren oder in Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirts die Epithelschichten überwinden und zu teilweise schwerwiegenden Infektionen führen. Für die Virulenz von *C. albicans* sind dessen Adhäsionsfähigkeiten, aber auch die Sekretion von Enzymen wie zum Beispiel der Phospholipase B oder Mitglieder der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen entscheidend. Von den Proteasen scheinen bei oralen Oberflächeninfektionen vorrangig Sap1 bis Sap3 von Bedeutung zu sein (Schaller *et al.*, 1998a). Inwieweit die beiden GPI verankerten Aspartatproteasen Sap9 und Sap10 bei dem ersten Kontakt mit dem Wirt bzw. bei oralen Oberflächeninfektionen von Bedeutung sind, sollte mit Hilfe des RHE (Reconstituted Human Epithelium) Models untersucht werden.

### III.13.1. Verringerte Virulenz als Folge der *SAP9* und *SAP10* Deletion im RHE Model

Bei dem RHE handelt es sich um Gewebemodelle mit humanen Epithelzellen (SkinEthic). Ein Vergleich der Einzelmantanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  als auch der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  mit den entsprechenden Retransformanten  $\Delta sap9[SAP9]$  und  $\Delta sap10[SAP10]$  sowie dem Wildtyp SC5314 bzw. dem Stamm CAI4::Clp in einem oralen RHE Model sollte Aufschluss über einen möglichen Einfluss von Sap9 und Sap10 auf die Interaktion von *C. albicans* mit oralem Epithelgewebe geben. Hierzu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen einer jeweiligen 24- stündigen semisynchronisierten Flüssigkultur auf das orale RHE ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) amplifiziert. Nach einer zwölfstündigen Inkubationszeit wurde das RHE auf mögliche Schäden hin untersucht. Die dazu durchgeführten histologischen lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit M. Schaller, Universität Tübingen. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich die beiden Stämme SC5314 und CAI4::Clp in ihrem Verhalten im RHE Model nicht unterscheiden. Daher wurde im weiteren Verlauf auf die Mitführung des Stammes CAI4::Clp verzichtet.

Wie in Abbildung 21 deutlich wird, war die Schädigung des RHEs durch den Wildtyp nach 12 Stunden weit fortgeschritten. Im Vergleich dazu führte sowohl die Deletion von *SAP9* als auch die von *SAP10* zu einer eindeutigen Verringerung der Epithelschädigung (Abb. 21). Dieser Phänotyp konnte durch die jeweilige Retransformante aufgehoben werden, da  $\Delta sap9[SAP9]$  und  $\Delta sap10[SAP10]$  ein dem Wildtyp entsprechendes Verhalten aufwiesen (Abb. 21).

**Abbildung 21. Infektion des oralen Epithelmodells RHE**

$2 \times 10^5$  Zellen von 24-stündigen semisynchronisierten Flüssigkulturen der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  wurden auf das RHE Model ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) pipettiert. Nach einer zwölfstündigen Inkubationszeit wurde das RHE auf mögliche Schäden hin untersucht.

Der Phänotyp einer deutlich geringeren Zerstörung des RHE Modells durch die Mutanten wurde durch die Retransformantenstämme ( $\Delta sap9[SAP9]$ ,  $\Delta sap10[SAP10]$ ) aufgehoben.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit M. Schaller, Universität Tübingen.

Eine Möglichkeit zur quantitativen Beschreibung der Epithelzellschädigung bietet die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität des umgebenden Mediums. Dieses intrazellulär lokalisierte Enzym ist nur nach Zerstörung von Epithelzellen im Medium nachweisbar. Der quantitative Vergleich der LDH Aktivitäten von RHE Gewebe, das mit den Mutantenstämmen  $\Delta sap9$  ( $23 \pm 3,5$  Units / ml),  $\Delta sap10$  ( $21 \pm 5,6$ ) oder  $\Delta sap9/\Delta sap10$  ( $24 \pm 3,5$ ) einerseits und mit dem Wildtyp ( $44 \pm 1,4$ ) andererseits infiziert war, bestätigt die oben beschriebenen Ergebnisse der Lichtmikroskopie. In allen Mutantenansätzen sinkt die LDH Aktivität des Mediums signifikant ab. Im Gegensatz dazu erreichen die LDH Werte bei einer Inkubation des RHEs mit den Retransformanten  $\Delta sap9[SAP9]$  ( $41 \pm 1,4$ ) und  $\Delta sap10[SAP10]$  ( $32 \pm 7,1$ ) nahezu Wildtypniveau. Ein Ansatz ohne Zugabe einer *Candida* Kultur diente als Negativkontrolle (PBS Kontrolle,  $5 \pm 0,4$ ). Die Ergebnisse der LDH Aktivitätsbestimmungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Deletion von *SAP9* oder / und *SAP10* zu einer signifikanten Abschwächung der Schädigung des Epithels im RHE Model führt. Die Auswirkungen der Deletion könnten bereits bei der initialen Adhäsion aber auch zu einem späteren Zeitpunkt, während des Eindringens in die Epithelschicht von Bedeutung sein.

**Tabelle 10. LDH Aktivitätsbestimmungen bei der Infektion des oralen Infektionsmodells RHE**

PBS- Kontrolle	5 U / ml ( $\pm 0,4$ )	Wildtyp	44 U / ml ( $\pm 1,4$ )
$\Delta sap9$	23 U / ml ( $\pm 3,5$ ) *	$\Delta sap9[SAP9]$	41 U / ml ( $\pm 1,4$ )
$\Delta sap10$	21 U / ml ( $\pm 5,6$ ) *	$\Delta sap10[SAP10]$	32 U / ml ( $\pm 7,1$ )
$\Delta sap9/\Delta sap10$	24 U / ml ( $\pm 3,5$ ) *		

U / ml = Units / ml

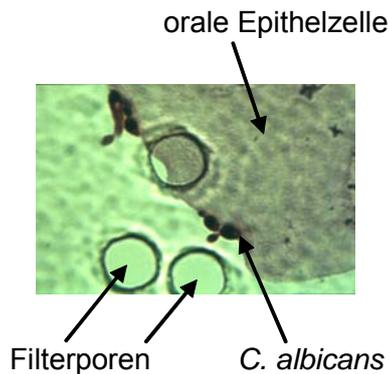
\* statistisch signifikanter Unterschied zum Wildtyp,  $p < 0,05$

### **III.14. Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 während der Adhäsion an humane Epithelzellen**

Das erste Stadium der Interaktion von *C. albicans* mit dem Wirt beinhaltet die Adhäsion des Pilzes an die Schleimhaut des Wirtes. Dieser Schritt ist sowohl für eine Kolonisierung, als auch für eine Infektion von Bedeutung, weshalb die Adhäsionsfähigkeit auch zu den Virulenzfaktoren gezählt wird. Es wird vermutet, dass die im Vergleich zu *C. albicans* geringere Virulenz weiterer, medizinisch relevanter *Candida* Spezies unter anderem in deren schwächeren Adhäsionseigenschaften begründet liegt. In *C. albicans* führte die Deletionen der Gene *SAP9* und *SAP10* zu einer abgeschwächten Virulenz im RHE Model. Ob dies auf eine verminderte Adhäsion der Mutantenstämme zurückzuführen ist, wurde in einem Adhäsionsassay analysiert.

#### **III.14.1. Unterschiedliches Adhäsionsverhalten als Folge der *SAP9* und *SAP10* Deletion**

Zur Untersuchung der Adhäsionseigenschaften der  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Einzelmutanten, sowie der  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Doppelmutante wurden orale Epithelzellen (Buccal Epithelial Cells – BECs) eingesetzt. Bei diesem *ex vivo* Assay werden die Epithelzellen frisch von der Wangeninnenseite eines gesunden Spenders gewonnen und zusammen mit dem jeweiligen *Candida* Stamm inkubiert. Nicht adhärenente *Candida* Zellen werden durch einen Filter abgetrennt. Die auf dem Filter verbliebenen Epithelzellen werden mit Hilfe eines Mikroskops auf das Vorhandensein von adhärenenten *Candida* Zellen überprüft. Ein Mikroskopausschnitt ist in Abbildung 22 dargestellt.

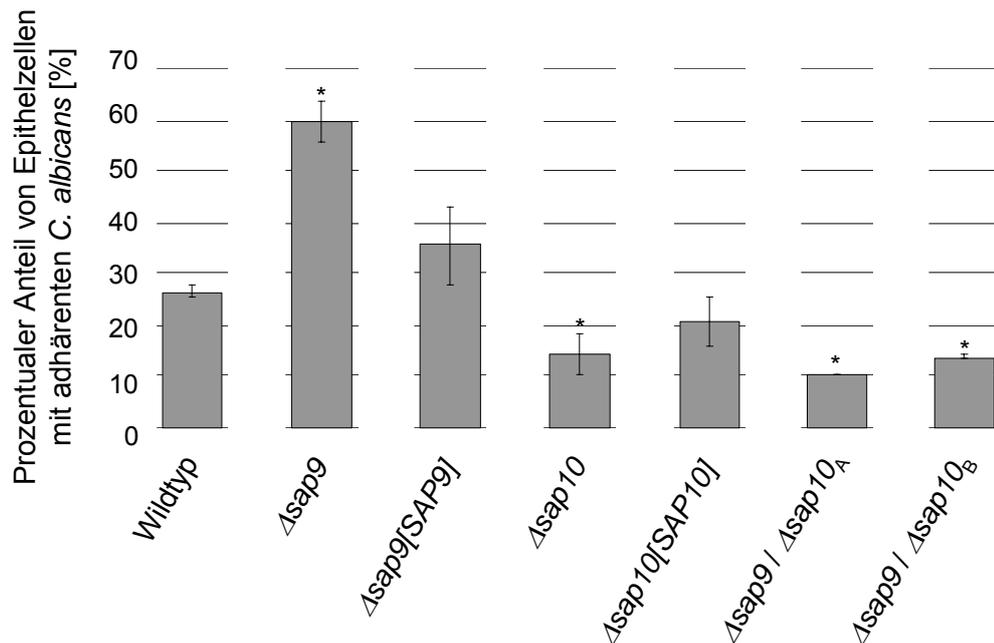


**Abbildung 22. Lichtmikroskopische Aufnahme einer oralen Epithelzelle mit adhärenen *C. albicans* Zellen**

Die quantitative Auswertung des Adhäsionsassays erfolgte durch die mikroskopische Auszählung oraler Epithelzellen mit bzw. ohne adhärenen *C. albicans* Zellen. Nicht adhärenen *Candida* Zellen wurden zuvor mit Hilfe eines Filters abgetrennt.

Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten beobachtet zeigte sich auch diesmal kein unterschiedliches Verhalten der beiden Stämme SC5314 und CAI4::Clp. In den weiteren Ausführungen wurde daher nur der Wildtyp SC5314 in Betracht gezogen.

Beim Vergleich des Adhäsionsverhaltens der Einzelmutanten mit dem des Wildtyps wird deutlich, dass die Deletion der entsprechenden Gene verschiedene Auswirkungen hat. Die Adhäsionsfähigkeit der  $\Delta sap9$  Mutante, bei der 59,6% ( $\pm 4,3$ ) der Epithelzellen mit adhärenen *Candida* Zellen assoziiert waren, war gegenüber dem Wildtyp mit 26,5% ( $\pm 1,2$ ) signifikant angestiegen. Die Retransformante  $\Delta sap9[SAP9]$  näherte sich in ihrem Verhalten (35,7%  $\pm 7,6$ ) dem des Wildtyps an, erreichte jedoch nicht vollständig dessen Niveau. Im Gegensatz zur  $\Delta sap9$  Mutante lagen bei der  $\Delta sap10$  Mutante mit 14,5% ( $\pm 3,8$ ) signifikant weniger Epithelzellen mit adhärenen *Candida* Zellen vor, als bei der Inkubation mit dem Wildtyp. Auch hier erreichte die Retransformante  $\Delta sap10[SAP10]$  mit 20,6% ( $\pm 4,9$ ) nicht vollends die Werte des Wildtypniveaus. Interessant war in diesem Zusammenhang das Verhalten der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$ , deren Adhäsionsfähigkeit ebenfalls signifikant absank. Mit 10,4% ( $\pm 0,1$ ) bzw. 13,8% ( $\pm 0,6$ ) ähnelten diese Werte zweier isogener Doppelmutanten dem Wert der  $\Delta sap10$  Einzelmutante. Demnach war die Deletion von *SAP10* in Bezug auf die Adhäsion an Epithelzellen dominant gegenüber der von *SAP9*. Das Adhäsionsverhalten aller Stämme ist in der Abbildung 23 dargestellt.



\* statistisch signifikanter Unterschied zum Wildtyp,  $p < 0,05$

**Abbildung 23. Adhäsionsverhalten der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$**

Orale Epithelzellen wurden frisch von der Wangeninnenseite eines gesunden Spenders gewonnen und zusammen mit den Mutantenstämmen  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  sowie den isogenen Stämmen  $\Delta sap9 / \Delta sap10_A$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10_B$  inkubiert. Nicht adhären *Candida* Zellen wurden durch einen Filter abgetrennt.

Die Deletion des *SAP9* Gens führte zu einer deutlichen Erhöhung der Adhäsionsfähigkeit gegenüber dem Wildtyp. Die Mutanten  $\Delta sap10$  und  $\Delta sap9 / \Delta sap10$  wiesen eine signifikant verringerte Adhäsion auf. Die Phänotypen der Mutanten wurden durch die Retransformantenstämme ( $\Delta sap9[SAP9]$ ,  $\Delta sap10[SAP10]$ ) aufgehoben.

Demzufolge kann die unter III.13.1 beschriebene verringerte Virulenz der Mutanten im RHE Model nur bedingt mit einer abgeschwächten Adhäsion erklärt werden. Im Falle der  $\Delta sap10$  Mutante ist es denkbar, dass die verminderte Adhäsion direkt für die Virulenzverringering verantwortlich ist. Für die  $\Delta sap9$  Mutante, bei der eine erhöhte Adhäsion an Epithelzellen zu beobachten war, gilt dies jedoch nicht.

### **III.15. Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 während systemischer Infektionen**

Die bisherigen Untersuchungen zu der Interaktion zwischen *C. albicans* und dem Wirt umschlossen das *in vitro* RHE – (III.13) und *ex vivo* Adhäsionsmodell (III.14). In beiden Fällen zeigten die Einzel- und Doppelmутanten, denen die Gene *SAP9* und / oder *SAP10* fehlten, ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten. Beide Modelle sind mit oberflächlichen Infektionen vergleichbar, so dass den Proteasen Sap9 und Sap10 eine mögliche Rolle während dieser Infektionen zugeschrieben werden kann. Ein *in vivo* Tiermodell wurde für die Untersuchung der Bedeutung dieser beiden Aspartatproteasen während einer systemischen Infektion genutzt.

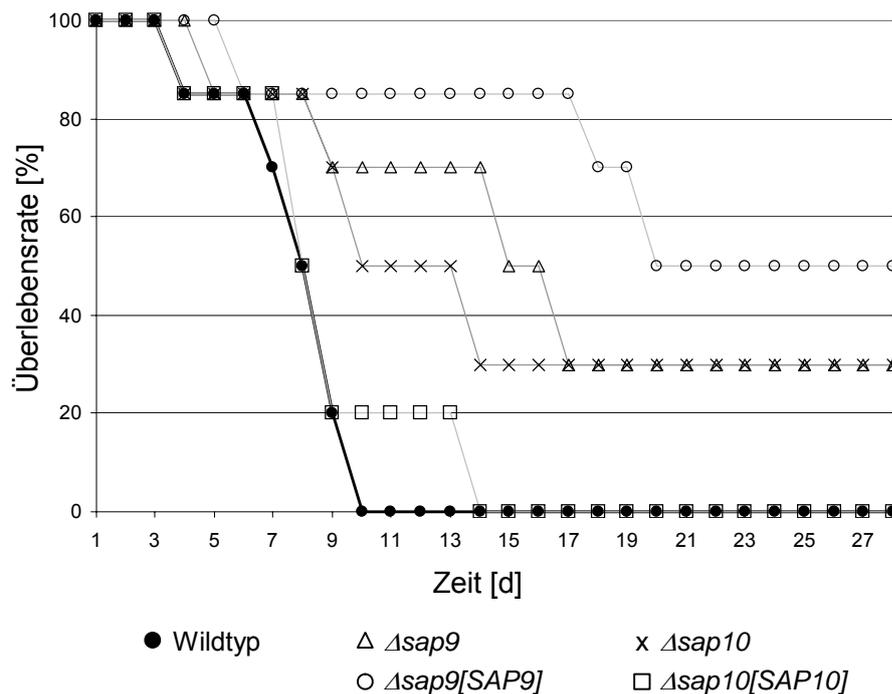
#### **III.15.1. Moderate Abschwächung der Virulenz als Folge der *SAP9* und *SAP10* Deletion im Tiermodell**

Systemische Infektionen wurden im *in vivo* Mausmodell untersucht. Dabei wurden die zu vergleichenden Stämme jeweils intravenös injiziert und auftretende Organschäden bzw. die Sterberate der Tiere dokumentiert. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit D. MacCallum und F. Odds, Universität Aberdeen / UK durchgeführt.

Bei Betrachtung der Sterberaten ist zu erkennen, dass sich die beiden Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  annähernd gleich verhielten. Ähnlich der Infektion mit dem Wildtyp, bei der die ersten Todesfälle (15%) am Tag vier nach der Infektion auftraten, war dies bei  $\Delta sap9$  am fünften und  $\Delta sap10$  am vierten Tag zu beobachten. Im Gegensatz zum Wildtyp, mit einer Sterberate von 100% am zehnten Tag nach der Infektion, lag die Sterberate der, mit  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  infizierten Mäuse an diesem Tag bei deutlich geringeren 30%. Die maximale Sterberate von 70% war nach 17 ( $\Delta sap9$ ) bzw. 14 ( $\Delta sap10$ ) Tagen erreicht und blieb bis zum Ende des Experiments, 28 Tage nach der Infektion, unverändert. Die entsprechenden

Retransformantenstämme waren nur bedingt in der Lage, den Phänotyp des Wildtyps wieder herzustellen. Die Infektion mit  $\Delta sap9[SAP9]$  bewirkte sogar eine noch stärkere Abschwächung der Virulenz, als es für die Mutante  $\Delta sap9$  zu beobachten war. Die ersten Todesfälle (15%) traten hier am sechsten Tag nach der Infektion auf, und die maximale Sterberate lag mit Beendigung des Experiments bei 50% und somit unterhalb der maximalen Rate der Mutante (70%). Dieses widersprüchliche Verhalten der Retransformante war unerwartet, da alle bisherigen phänotypischen Analysen (siehe III.9 bis III.14) der Retransformante eine Rückgewinnung des Verhaltens mit annäherndem Wildtypniveau zeigen konnten. Ein solch widersprüchliches Verhalten scheint jedoch bei dieser Art von Tierversuchen nicht besonders außergewöhnlich zu sein (F. Odds, persönliche Mitteilung). Die Retransformante  $\Delta sap10[SAP10]$  wies ein solches unerwartetes Verhalten nicht auf. Gleich dem Wildtyp traten die ersten Todesfälle am vierten Tag nach der Infektion auf. Am Tag zehn lag  $\Delta sap10[SAP10]$  mit 80% unterhalb der Sterberate des Wildtyps mit 100%. Diese Rate wurde jedoch 14 Tage nach Infektion erreicht. Eine zusammenfassende Graphik des zeitlichen Verlaufs nach der Infektion ist in Abbildung 24 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  in ihrer Virulenz im *in vivo* Mausmodell moderat abgeschwächt waren. Dieser Phänotyp konnte durch die Retransformante  $\Delta sap10[SAP10]$  auf nahezu Wildtypniveau aufgehoben werden. Das ungewöhnliche Verhalten der  $\Delta sap9[SAP9]$  Retransformante und die ausbleibende Aufhebung des Mutantenphänotyps kann nicht eindeutig erklärt werden.



**Abbildung 24. Systemische Infektion im Mausmodell**

Zu untersuchende *Candida* Stämme wurden intravenös in Mäuse injiziert und die Sterberate der Tiere dokumentiert. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  in ihrer Virulenz im Mausmodell moderat abgeschwächt. Dieser Phänotyp wurde durch die Retransformante  $\Delta sap10[SAP10]$  auf nahezu Wildtypniveau aufgehoben. Die Retransformante  $\Delta sap9[SAP9]$  zeigte eine unerwartet stärkere Abschwächung der Virulenz gegenüber dem Wildtyp und der  $\Delta sap9$  Mutante.

Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit D. MacCallum und F. Odds, Universität Aberdeen / UK.

### III.16. Substrat – und pH – Spezifität der beiden Proteasen Sap9 und Sap10

Den Mitgliedern der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen werden Funktionen zugeschrieben, welche die Bereitstellung von Nährstoffen, die Begünstigung der Penetration und Invasion, sowie die Modulation von Aktivitäten des Immunsystems oder dem Entkommen der Immunantwort des Wirts umfassen. Demnach geht man bei den Saps von einer Hydrolyse externer Proteine nach Sekretion in den extrazellulären Raum aus. Jedoch

wurden lediglich für Sap2 Substrate, wie z.B. Collagen, Keratin oder Mucin identifiziert.

Für Sap9 und Sap10 konnte gezeigt werden, dass diese Proteasen nicht in das umgebende Medium abgegeben werden, sondern an der Zelloberfläche verankert sind (siehe III.3 und III.4). Die somit verhinderte Sekretion schließt jedoch die Prozessierung externer Substrate nicht aus. Weiterhin sind Sap9 und Sap10 für die Integrität der Zelloberfläche von Bedeutung (siehe III.9 bis III.11). Es musste daher gefolgert werden, dass pilzeigene Proteine zu den Substraten der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 zählen.

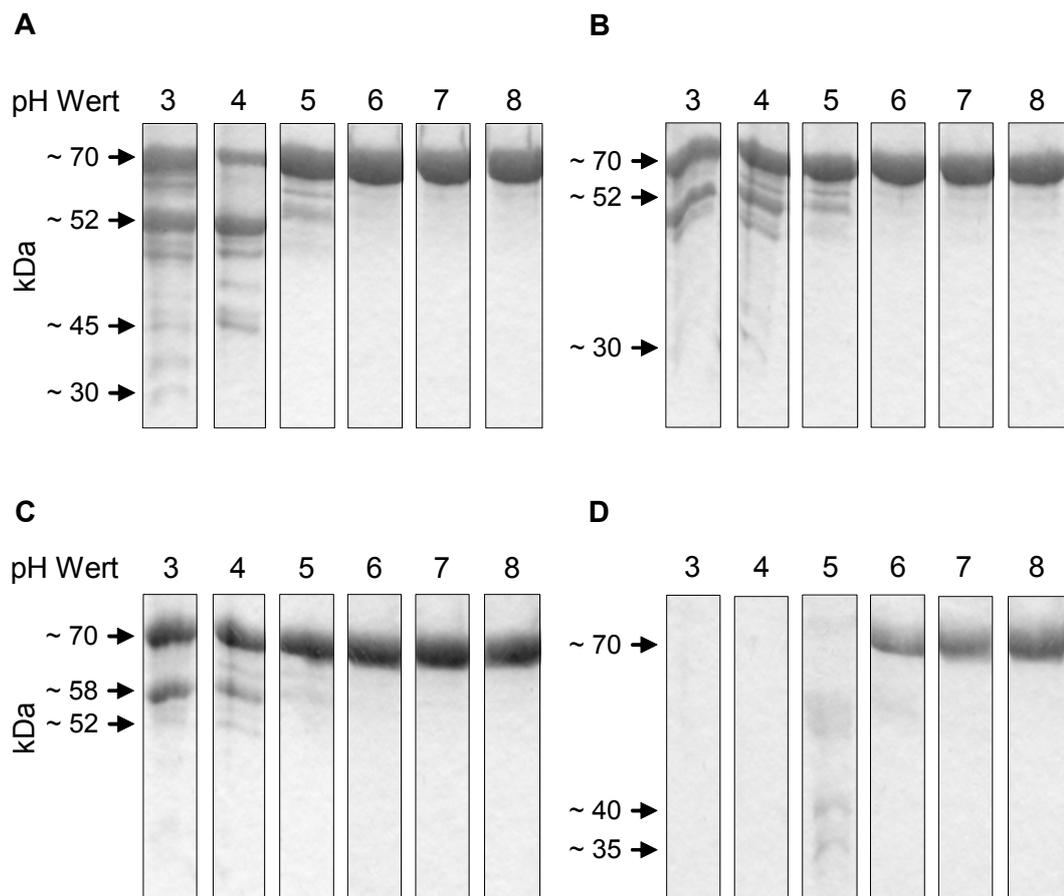
Unter Verwendung der heterolog exprimierten Proteasen (siehe III.3) sollten mögliche Substrate von Sap9 und Sap10 untersucht werden.

### **III.16.1. Humane Proteine und Bovine Serum Albumin gehören nicht zu den Substraten von Sap9 und Sap10**

Bei der Untersuchung möglicher Substrate der Proteasen Sap9 und Sap10 wurden in einer ersten Analyse vorrangig bekannte Substrate von Sap2 getestet. Dabei handelte es sich um die humanen strukturellen Proteine Collagen, Fibronectin, Keratin und Mucin, Immunoglobulin G (IgG) als Bestandteil des Immunsystems und dem, die Sap Produktion *in vitro* induzierenden BSA. Die einzelnen Substrate wurden dabei mit den heterolog exprimierten Proteasen Sap9 und Sap10 inkubiert. Zur Bestimmung eines möglichen pH Optimums variierte der Reaktionspuffer dabei in seinem pH Wert in den Bereichen von 3,0 bis 8,0. Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden mittels SDS PAGE auf mögliche Substratprozessierungen hin untersucht.

Die Analyse der getesteten Substanzen Collagen, Fibronectin, IgG, Keratin und Mucin ergab, dass diese weder von Sap9 noch von Sap10 prozessiert werden und somit wahrscheinlich nicht als natürliche Substrate der beiden Proteasen fungieren. Wie in Abbildung 25A und B dargestellt, sind für das potentielle Substrat BSA unter bestimmten Reaktionsbedingungen, in einem

pH Bereich von 3,0 bis 5,0 zusätzliche Banden zu beobachten, die auf einen proteolytischen Abbau hindeuten. Das dies nicht eindeutig auf eine Proteaseaktivität zurückzuführen ist, sondern hauptsächlich mit der pH Wert – abhängigen Stabilität des BSA im Zusammenhang steht, wird anhand der Kontrollansätze (BSA und Reaktionspuffer ohne Proteasezugabe) deutlich (Abb. 25C). Eine klare proteolytische Aktivität im sauren pH Bereich war unter Verwendung der heterolog exprimierten Protease Sap2 nachweisbar (Abb. 25D), wodurch die generelle Funktionalität des Versuchsablaufs bestätigt wurde. Allerdings muss angemerkt werden, dass zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen kein bekanntes Substrat von Sap9 oder Sap10 zur Verfügung stand und somit eine tatsächlich vorhandene Aktivität dieser Proteasen nicht überprüft werden konnte.



### Abbildung 25. SDS PAGE des BSA nach Inkubation mit Sap9 und Sap10

Bovine Serum Albumin (BSA), welches die Sap Produktion *in vitro* induziert, wurde mit den heterolog exprimierten Proteasen Sap9 (A) und Sap10 (B) bei unterschiedlichen pH Werten (pH 3 bis pH 8) für 12 h inkubiert. Als Kontrollansätze dienten BSA ohne Proteasezugabe (C) und BSA mit Zugabe der Protease Sap2 (D). Nach der Inkubation mit Sap9 und Sap10 bei niedrigen pH Werten auftretende zusätzliche Proteinbanden (Größenangaben in kDa) sind vorrangig auf die pH Wert – abhängige Stabilität des BSA zurückzuführen, was beim Vergleich mit dem Ansatz ohne Proteasezugabe deutlich wird. Die Inkubation mit Sap2 führte zu einem deutlichen proteolytischen Verdau des BSA bei niedrigen pH Werten.

### III.16.2. Substratspezifität von Sap9 und Sap10 ähnelt der von Yapsinen aus *S. cerevisiae*

Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 erfolgten in Zusammenarbeit mit I. Pichova, Institut für organische Chemie und Biochemie in Prag / Tschechische Republik. Neben den bereits erwähnten, nicht prozessierten Substanzen wurde auch das Protein Vimentin der Maus mit in die Untersuchungen einbezogen. Dabei handelt es sich um das Zytoskelettprotein der mesenchymalen Zellen, einschließlich Fibroblasten oder Leukozyten. Für Sap9 konnten drei Prozessierungsstellen innerhalb des Vimentins nachgewiesen und mit Hilfe der MALDI – TOF Massenspektroskopie analysiert werden. Demnach schneidet die Protease Sap9 in allen drei Fällen nach Lysin (Tab. 11). Eine Prozessierung durch Sap10 konnte auch bei Vimentin nicht nachgewiesen werden.

**Tabelle 11. Prozessierungsmuster der Proteasen Sap9 und Sap10**

Prozessierung			
nach Arg oder Lys		nach Lys, Phe oder His	
Peptidsequenz	Ursprung	Peptidsequenz	Ursprung
TTTKR* <u>S</u> AGF	Sap2	RTNEK* <u>V</u> ELQ	Vimentin
<u>K</u> * <u>T</u> SKR* <u>Q</u> AVP	Sap2	NTEF <u>K</u> * <u>N</u> TRT	Vimentin
PISK <u>R</u> * <u>N</u> ERS	Sap9	KGQ <u>G</u> K* <u>S</u> RLG	Vimentin
PISK <u>R</u> * <u>E</u> RS	Sap9 (modifiziert)	<u>F</u> * <u>S</u> V <u>V</u> K* <u>T</u> PKA	Sap2
<u>R</u> * <u>F</u> VKR* <u>D</u> GSL	Sap9	ANK <u>K</u> * <u>T</u> GAFF	Sap7
		KI <u>H</u> * <u>N</u> K* <u>L</u> FGF	Sap9
		NVT <u>V</u> K* <u>D</u> LSF	Sap9

Stern: Prozessierung; unterstrichen: Prozessierung durch Sap9; gestrichelte Linie: Prozessierung durch Sap10; grau unterlegt: Prozessierung durch Sap9 und Sap10

Des Weiteren wurden Peptide für die Analyse der Spezifität der Proteasen Sap9 und Sap10 synthetisiert. Die Peptide leiten sich zum einen aus den nun bekannten Prozessierungsstellen des Vimentin, und zum anderen aus den Präproproteinsequenzen der Proteasen Sap2, Sap7 und Sap9 ab. Zum Teil beinhalten Letztere putative Kex2 Prozessierungssequenzen (Lys/Arg und Lys/Lys). Diese Auswahl erfolgte aufgrund einer möglichen überlappenden Funktion ähnlich der Kex2 Protease und der GPI verankerten Aspartatprotease Yapsin1 aus *S. cerevisiae*. Die Analyse der Peptidprozessierungen durch MALDI – TOF Massenspektroskopie konnte spezifische Schnittstellen der Proteasen Sap9 und Sap10 identifizieren. Wie die in Tabelle 11 zusammengefassten Sequenzen inklusive der jeweiligen Prozessierungsstellen verdeutlichen, besitzen Sap9 und Sap10 zum Teil identische Erkennungssequenzen. Daneben besitzen sie jedoch weitere, spezifische Schnittstellen, welche nur von einer der beiden Proteasen erkannt wurden. Ein interessantes Ergebnis lieferte die Analyse der von der Sap9 Sequenz abgeleiteten Peptide PISKRNERS und PISKRERS. Diese beiden Peptide unterscheiden sich nur durch die An – bzw. Abwesenheit der Aminosäure Asparagin (N). Diese Modifikation hat jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Prozessierung. So wurde das Peptid PISKRERS sowohl von Sap9 als auch von Sap10 geschnitten, wohingegen das Vorhandensein des Asparagins in der Sequenz PISKRNERS die Prozessierung durch Sap9 verhinderte (Tab. 11). Ebenfalls von besonderem Interesse ist das aus der Sap9 Proteinsequenz stammende Peptid KIHNKLFGE, welche von Sap9 und Sap10 auf unterschiedliche Weise prozessiert wurde. Die Protease Sap9 schnitt hierbei zwischen den beiden Aminosäuren Lysin (K) und Leucin (L). Betrachtet man die gesamte Sap9 Proteinsequenz, so ist die, bei einer solchen Prozessierung entstandene, neue N-terminale Sequenz (NH<sub>3</sub>-LFGF ... -COOH) identisch mit dem N-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit des Sap9 Proteins, welche durch Cawley *et al.* sequenziert wurde (Cawley *et al.*, 2003). Eine Selbstprozessierung der Protease Sap9 ist somit wahrscheinlich.

Das pH Optimum der Proteasen Sap9 und Sap10 lag in den erwähnten Untersuchungen bei 6,5, wobei noch bei pH Werten von 5,5 und 7,5 die beschriebenen Prozessierungen auftraten.

Diese Daten zeigen, dass die beiden Proteasen Sap9 und Sap10 spezifische Proteinsequenzen erkennen. Die analysierte Prozessierung ähnelte der Aktivität der Kex2 Protease oder auch der Aktivität der Yapsine von *S. cerevisiae*. Sap10 besitzt darüber hinaus weitere, für Aspartatproteasen bisher nicht beschriebene Erkennungssequenzen. Bekannte Substrate anderer Saps (vorrangig Sap2) wurden von Sap9 und Sap10 nicht prozessiert. Als natürliche Substrate werden daher eher pilzeigene Proteine vermutet.

### **III.17. Überexpressionen von *SAP9* in der $\Delta kex2$ und $\Delta sap10$ Mutante sowie von *SAP10* in der $\Delta kex2$ und $\Delta sap9$ Mutante**

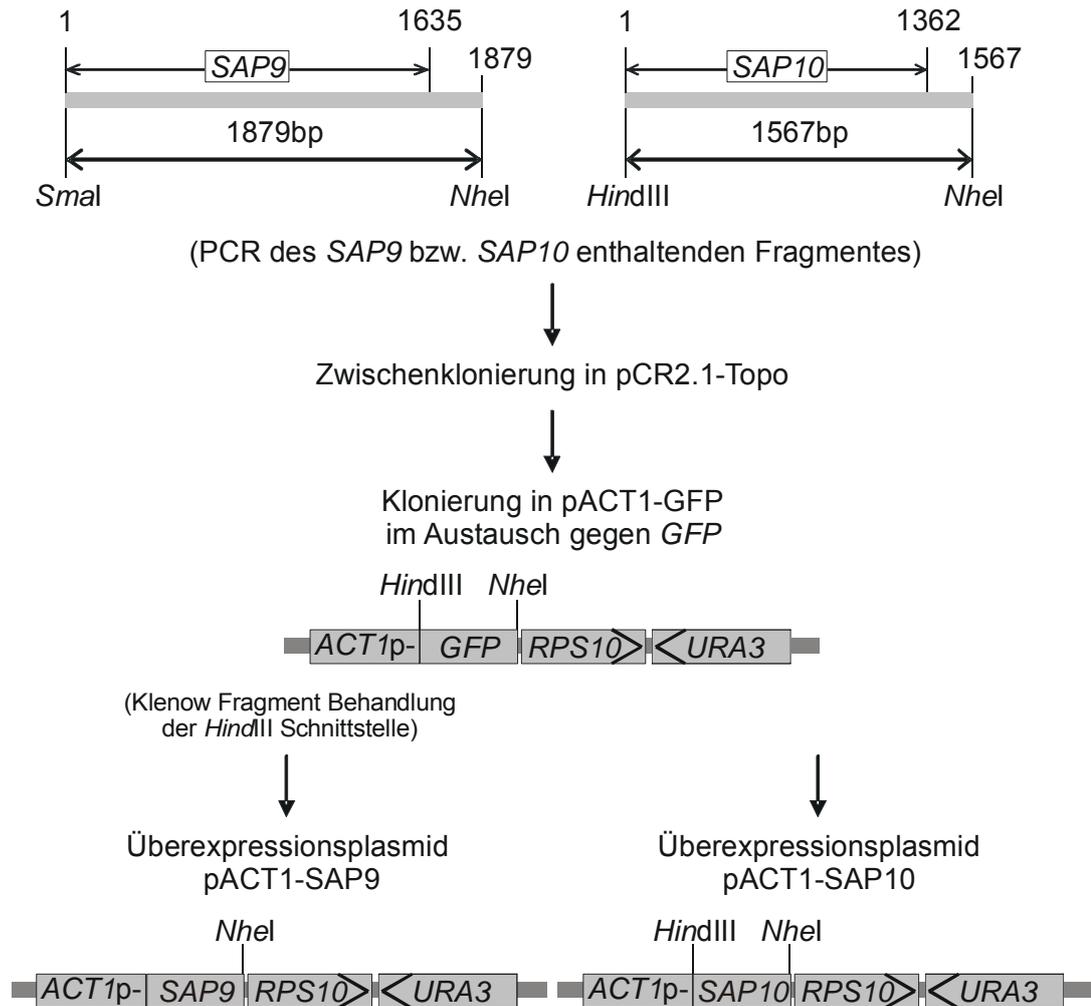
Ist ein Gen bzw. dessen Genprodukt aufgrund einer Mutation nicht funktionsfähig, können daraus resultierende Mängel auf verschiedene Art und Weise kompensiert werden. So könnte der erhöhte Chitingehalt der Zellwand in den  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Mutanten eine indirekte Antwort auf die Genmutationen sein. In diesem Fall wäre es denkbar, dass die Zelle mutationsbedingte Schwächen der Zelloberflächenintegrität durch eine verstärkte Chitineinlagerung auszugleichen versucht. Eine andere Möglichkeit wäre die direkte Übernahme der fehlenden Aktivität durch andere Proteine. So konnte für *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die GPI verankerte Aspartatprotease Yapsin1 die Prozessierung des Präpheromons MF $\alpha$  in der  $\Delta kex2$  Mutante übernehmen kann (Egel-Mitani *et al.*, 1990; Komano and Fuller, 1995).

Das phänotypische Verhalten der Mutanten, denen die Gene *SAP9* und / oder *SAP10* fehlen, und die Prozessierungsmuster der heterolog exprimierten Proteasen Sap9 und Sap10 (siehe III.16) deuten darauf hin,

dass diese beiden Proteasen untereinander bzw. auch mit der Kex2 Protease des Golgi Apparates überlappende Funktionen haben. Mit Hilfe von Überexpressionskonstrukten sollten eventuell vorhandene funktionelle Überlappungen untersucht werden.

### III.17.1. Konstruktion der Überexpressionsstämme

Zur Analyse möglicher überlappender Funktionen der drei Proteasen Sap9, Sap10 und Kex2 wurden die entsprechenden Mutantenstämme so modifiziert, dass jeweils Sap9 oder Sap10 unter Kontrolle des konstitutiven *ACT1* Promotors überexprimiert wurden. Dazu wurden die *SAP9* (1 bis +1879) und *SAP10* (1 bis +1567) Sequenzen unter Verwendung der Primer *SAP9*-fwd11 / *SAP9*-rev11 und *SAP10*-fwd3 / *SAP10*-rev3 bei gleichzeitiger Generierung der Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Sma*I, *Nhe*I (*SAP9*) sowie *Hind*III, *Nhe*I (*SAP10*) amplifiziert und die resultierenden PCR Fragmente in den Topo TA Cloning Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert und als pCR2.1-TOPO-*SAP9*<sub>Üb</sub> bzw. pCR2.1-TOPO-*SAP10*<sub>Üb</sub> bezeichnet. Diese Fragmente wurden genutzt, um das *GFP* des Vektors pACT1-GFP mit Hilfe der *Hind*III, *Nhe*I Schnittstellen (Klenow Fragment Behandlung der vektoreigenen *Hind*III Schnittstelle für die Ligation mit *Sma*I des *SAP9* Fragments) zu ersetzen, wodurch die Plasmide pACT1-*SAP9* und pACT1-*SAP10* entstanden (Abb. 26). Das Kontrollplasmid pACT1, welches den *ACT1* Promotor ohne *GFP* enthält, wurde durch die Inkubation des pACT1-GFP mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Nhe*I erzeugt. Nach erfolgter Transformation der linearisierten Plasmide und Überprüfung der Integration in den *RPS10* Locus mittels Southern Blot Technik, standen die entsprechenden Überexpressionsstämme  $\Delta kex2$ [*PACT1SAP9*],  $\Delta kex2$ [*PACT1SAP10*],  $\Delta sap9$ [*PACT1SAP10*] und  $\Delta sap10$ [*PACT1SAP9*] zur Verfügung.



### Abbildung 26. Konstruktion der Überexpressionsplasmide pACT1-SAP9 und pACT1-SAP10

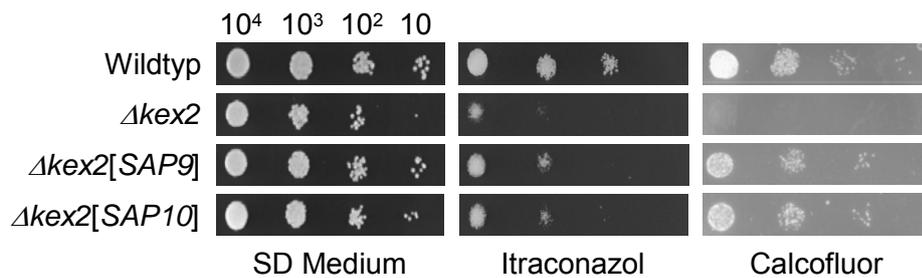
Für die Überexpression der Gene *SAP9* und *SAP10* wurden diese unter Kontrolle des *ACT1* Promotors konstitutiv exprimiert. Die Überexpressionsplasmide enthalten die *SAP9* (1 bis 1879) und *SAP10* (1 bis 1567) Sequenzen, welche die Bereiche vom Startcodon bis zirka 200 bp stromabwärts des Stoppcodons umfassen. Bei der Amplifikation dieser Sequenzen mittels PCR wurden Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Smal* und *NheI* bzw. *HindIII* und *NheI* generiert und nach erfolgter Zwischenklonierung in den Vektor pCR2.1-Topo für die Integration in den Vektor pACT1-GFP, im Austausch gegen das *GFP* Fragment genutzt. Für die Integration des *Smal* / *NheI* *SAP9* Fragmentes war eine Klenow Fragment Behandlung der pACT1-GFP vektoreigenen *HindIII* Schnittstelle nötig. Die Plasmide pACT1-SAP9 und pACT1-SAP10 enthalten die *RPS10* Sequenz für eine gezielte genomische Integration am *RPS10* Locus, sowie das *URA3* Gen als Selektionsmarker einer erfolgreichen Transformation.

### III.17.2. Funktionelle Überlappung der Proteasen Sap9, Sap10 und Kex2

Ein Vergleich des Wachstums von Mutanten und Überexpressionsstämmen auf Medien, die in den entsprechenden Proteasemutanten Phänotypen hervorrufen, sollte Aufschluss über vorhandene funktionelle Überlappungen geben. Aufgrund der unter III.9 beschriebenen Daten wurden die Antimykotika Amorolfin, Amphotericin B, Hygromycin B und Itraconazol sowie die Zellwand – bindenden Farbstoffe Calcofluor und Congo Red in den hier durchgeführten Tropftest Assay einbezogen. Darüber hinaus wurden die Substanzen bzw. Medien SDS und SD pH 8 eingesetzt, da das Wachstum der  $\Delta kex2$  Mutante unter diesen Bedingungen inhibiert wurde.

#### III.17.2.1. Überlappende Funktionen von Sap9 und Sap10 mit der Protease Kex2

Phänotypische Untersuchungen zu möglichen überlappenden Funktionen von Kex2 mit den Proteasen Sap9 und Sap10 unter Verwendung eines Tropftests und konstitutiv exprimierten *SAP9* oder *SAP10* Genen in der  $\Delta kex2$  Mutante zeigten kaum Hinweise für eine ähnliche Funktion. Von den getesteten Medien konnten nur bei Zusätzen mit Itraconazol oder Calcofluor für die Überexpressionsstämme  $\Delta kex2$ <sub>[*PACT1* *SAP9*]</sub> und  $\Delta kex2$ <sub>[*PACT1* *SAP10*]</sub> ein besseres Wachstum als bei der  $\Delta kex2$  Mutante gezeigt werden (Abb. 27). Das Wachstumsniveau des Wildtyps wurde dabei jedoch nicht erreicht. Somit war nur eine geringe funktionelle Überlappung der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 mit der Kex2 Protease nachweisbar. Es ist unklar, ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Funktionsausgleich durch Sap9 oder Sap10 gehandelt hat.



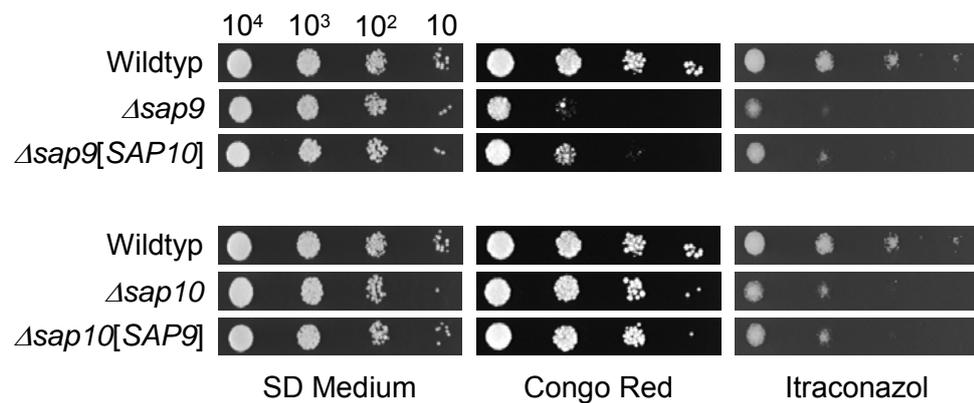
### Abbildung 27. Überlappende Funktionen der Proteasen Sap9 und Sap10 mit der Protease Kex2

Zu untersuchende Stämme wurden in mehreren Verdünnungsstufen (10 bis 10<sup>4</sup> Zellen) auf verschiedene Medien aufgetropft und in ihrem Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp verglichen. Als Kontrolle des gleichmäßigen Wachstums auf nicht selektivem Medium diente das SD Medium.

Die Hypersensitivität der Mutante  $\Delta kex2$  gegenüber Itraconazol (40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) und Calcofluor (800  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) wurde durch die Überexpressionsstämme  $\Delta kex2[SAP9]$  und  $\Delta kex2[SAP10]$  geringfügig aufgehoben und das Wachstum näherte sich dem Niveau des Wildtyps.

### III.17.2.2. Überlappende Funktion der Proteasen Sap9 und Sap10 untereinander

Ähnlich der Überexpression von Sap9 und Sap10 in der  $\Delta kex2$  Mutante war eine überlappende Funktion dieser beiden Proteasen untereinander nur bedingt nachweisbar. Die Überexpression von *SAP10* in der  $\Delta sap9$  Mutante ( $\Delta sap9[PACT1SAP10]$ ) bewirkte eine Wachstumsverbesserung gegenüber der  $\Delta sap9$  Mutante auf Medien mit den Zusätzen Congo Red und Itraconazol, wiederum ohne das Wachstumsniveau des Wildtyps zu erreichen (Abb. 28). Der Überexpressionsstamm  $\Delta sap10[PACT1SAP9]$  zeigte gegenüber der Mutante  $\Delta sap10$  auf allen getesteten Medien kein unterschiedliches Wachstumsverhalten, so dass eine eventuelle Funktionsübernahme des Sap9 Proteins in diesem Assay nicht nachweisbar war (Abb. 28).



### Abbildung 28. Überlappende Funktionen der Proteasen Sap9 und Sap10

Mehrere Verdünnungsstufen (10 bis  $10^4$  Zellen) der zu untersuchenden Stämme wurden auf verschiedene Medien aufgetropft und in ihrem Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp verglichen. Als Kontrolle des gleichmäßigen Wachstums auf nicht selektivem Medium diente das SD Medium.

Die Hypersensitivität der Mutante  $\Delta sap9$  gegenüber Congo Red (130  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) und Itraconazol (40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) wurde durch die Überexpression des *SAP10* Gens ( $\Delta sap9[SAP10]$ ) minimal aufgehoben. Die Überexpression des *SAP9* Gens in der  $\Delta sap10$  Mutante ( $\Delta sap10[SAP9]$ ) bewirkte keine erkennbaren Wachstumsvorteile.

Eine überlappende Funktion der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 untereinander bzw. mit der Kex2 Protease liegt also nach den hier geschilderten Untersuchungen nur partiell vor. Weitere, hier nicht beobachtete funktionelle Überlappungen, können aber nicht ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass in den entsprechenden Mutanten die Expression des jeweiligen noch vorhandenen Gens bereits hochreguliert war und somit eine, durch Fremdpromotor konstitutiv erzwungene Überexpression zu keiner weiteren Wachstumsverbesserung führte.

### III.18. Überexpressionen von *SAP9* und *SAP10* im Wildtyp

Bei der funktionellen Untersuchung eines Gens oder dessen Genproduktes kann die Überexpression dieses Gens und daraus resultierende Phänotypen hilfreiche Hinweise geben. In Abhängigkeit von der Funktion des Genproduktes können die auftretenden Phänotypen eine Begünstigung oder einen Nachteil gegenüber dem Wildtyp anzeigen. Aufgrund einer zelleigenen,

verzweigten und von verschiedenen Faktoren abhängigen posttranslationalen Regulation besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass eine induzierte Genüberexpression nicht zu einer quantitativen Steigerung der funktionsfähigen Proteinmenge führt. Mit Hilfe von Überexpressionskonstrukten der Gene *SAP9* und *SAP10* sollten mögliche Auswirkungen einer solchen Überexpression im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden.

### III.18.1. Konstruktion der Überexpressionstämme

Für die Konstruktion der Überexpressionstämme benötigten Plasmide standen bereits aus den vorangegangenen Experimenten zur Verfügung (III.17). Nach der Linearisierung dieser Plasmide, *pACT1-SAP9* und *pACT1-SAP10* sowie des Kontrollplasmids *pACT1*, erfolgte eine durch Southern Blot Technik überprüfte Integration in den *RPS10* Locus des Wildtypstammes *CAI4*, wodurch dieser *SAP9* oder *SAP10* unter Kontrolle des konstitutiven *ACT1* Promotors zusätzlich exprimierte (*CAI4*<sub>[*pACT1* *SAP9*]</sub> und *CAI4*<sub>[*pACT1* *SAP10*]</sub>).

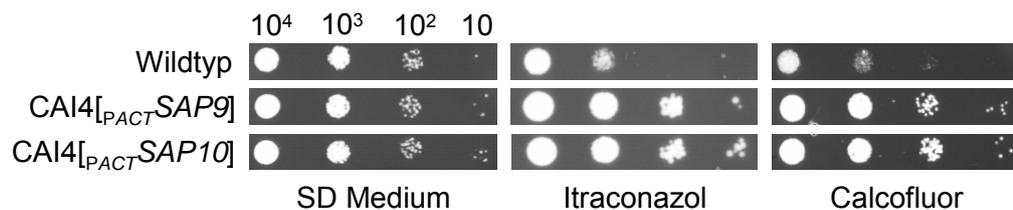
### III.18.2. Resistenzentwicklung gegenüber Zelloberflächen – angreifenden Substanzen in Folge der *SAP9* und *SAP10* Überexpression

Für die Analyse möglicher Auswirkungen der Überexpression von *SAP9* oder *SAP10* im Wildtyp wurde der Tropftest durchgeführt, welcher bereits für die Untersuchung der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  sowie  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Verwendung fand (III.9). Untersucht werden sollte das Wachstumsverhalten auf SD Medium im Vergleich zu Medien, welche bei den Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  sowie  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Phänotypen hervorrufen. Dazu gehörten

Medien mit den Wirkstoffen Amorolfiin, Amphotericin B, Hygromycin B und Itraconazol, sowie dem Zellwand – bindenden Farbstoff Calcofluor.

Die *SAP9* bzw. *SAP10* überexprimierenden Stämme CAI4<sub>[PACT1SAP9]</sub> und CAI4<sub>[PACT1SAP10]</sub> zeigten auf den genannten Medien ein gegenüber dem Wildtyp erhöhtes Wachstum (Abb. 29). Somit führte die Fremdpromotor – bedingte, konstitutive Überexpression der Gene *SAP9* und *SAP10* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Substanzen, welche die Zelloberfläche angreifen.

Demnach kann ein Angriff auf die Integrität der Zelloberfläche durch eine konstitutive Überexpression von *SAP9* und *SAP10* vermindert bzw. kompensiert werden. Dies verdeutlicht die Bedeutung von *Sap9* und *Sap10* für den Aufbau und die Funktionalität der Zelloberfläche.



#### Abbildung 29. Überexpression der Gene *SAP9* und *SAP10* im Wildtyp

Das Wachstumsverhalten der Überexpressionsstämme CAI4<sub>[PACT1SAP9]</sub> und CAI4<sub>[PACT1SAP10]</sub> wurde durch das Auftropfen in mehreren Verdünnungsstufen (10 bis 10<sup>4</sup> Zellen) auf verschiedenen Medien mit dem Wachstumsverhalten des Wildtyps verglichen. Als Kontrolle des gleichmäßigen Wachstums auf nicht selektivem Medium diente das SD Medium.

Die Überexpression der Gene *SAP9* und *Sap10* bewirkte einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp auf den Medien Itraconazol (50 µg / ml) und Calcofluor (800 µg / ml).

### **III.19. Expression von *SAP9* und *SAP10* im Wildtyp in Abhängigkeit des Anzuchtmediums**

Vorangegangene Untersuchungen konnten die Bedeutung der Aspartatproteasen Sap9 und Sap10 für die Integrität der Zelloberfläche aufzeigen. Mutantenstämme der beiden Proteasen waren gegenüber Substanzen, welche die Zelloberfläche direkt oder indirekt angreifen sensitiver als der vergleichbare Wildtyp (siehe III.9). Die konstitutive Überexpression von *SAP9* und *SAP10* führte in Anwesenheit dieser Substanzen zu einer Wachstumssteigerung gegenüber dem Wildtyp (III.18). Aussagen, inwieweit der Wildtyp selbst auf Zelloberflächenintegrität – angreifende Substanzen durch eine erhöhte *SAP9* und *SAP10* Expression reagiert, ließen sich zu diesem Zeitpunkt nicht treffen. Unter Einsatz der Real Time TaqMan™ PCR Technologie sollte daher die Expression der Protease Gene *SAP9* und *SAP10* im Wildtyp in Abhängigkeit des Anzuchtmediums untersucht werden.

#### **III.19.1. Quantitative Bestimmung der *SAP9* und *SAP10* Expression**

Die Real Time TaqMan™ PCR ermöglicht eine quantitative Messung des PCR Produkts während der Amplifikation, wodurch auch geringe Expressionsunterschiede erfassbar sind. Die Menge an Transkripten der Gene *SAP9* und *SAP10* innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase wurde durch Amplifikation unter Verwendung der Primerpaare QRT-SAP9fwd / QRT-SAP9rev und QRT-SAP10fwd / QRT-SAP10rev, sowie der jeweiligen Sonde QRT-SAP9Sonde und QRT-SAP10Sonde ermittelt, wobei die Expression des Haushalt – Gens *ACT1* für die benötigte Standardreihe durch Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares QRT-ACT1fwd / QRT-ACT1rev und der Sonde QRT-ACT1Sonde gemessen wurde. Bei der Auswahl der Anzuchtmedien wurden die Erkenntnisse des

Tropftests (siehe III.9) genutzt, bei dem unter anderem die Zusätze Hygromycin B und Itraconazol zu einem deutlich schwächeren Wachstum der  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Mutante führten. Medien, welche BSA oder das hypheninduzierende Serum enthalten, zeigten im erwähnten Tropftest keine deutlichen Phänotypen, wurden jedoch ebenfalls für die TaqMan™ Analyse aufgrund der bekannten Induktion anderer *SAP* Gene bzw. hinsichtlich morphologisch bedingter Änderungen der Zelloberfläche eingesetzt.

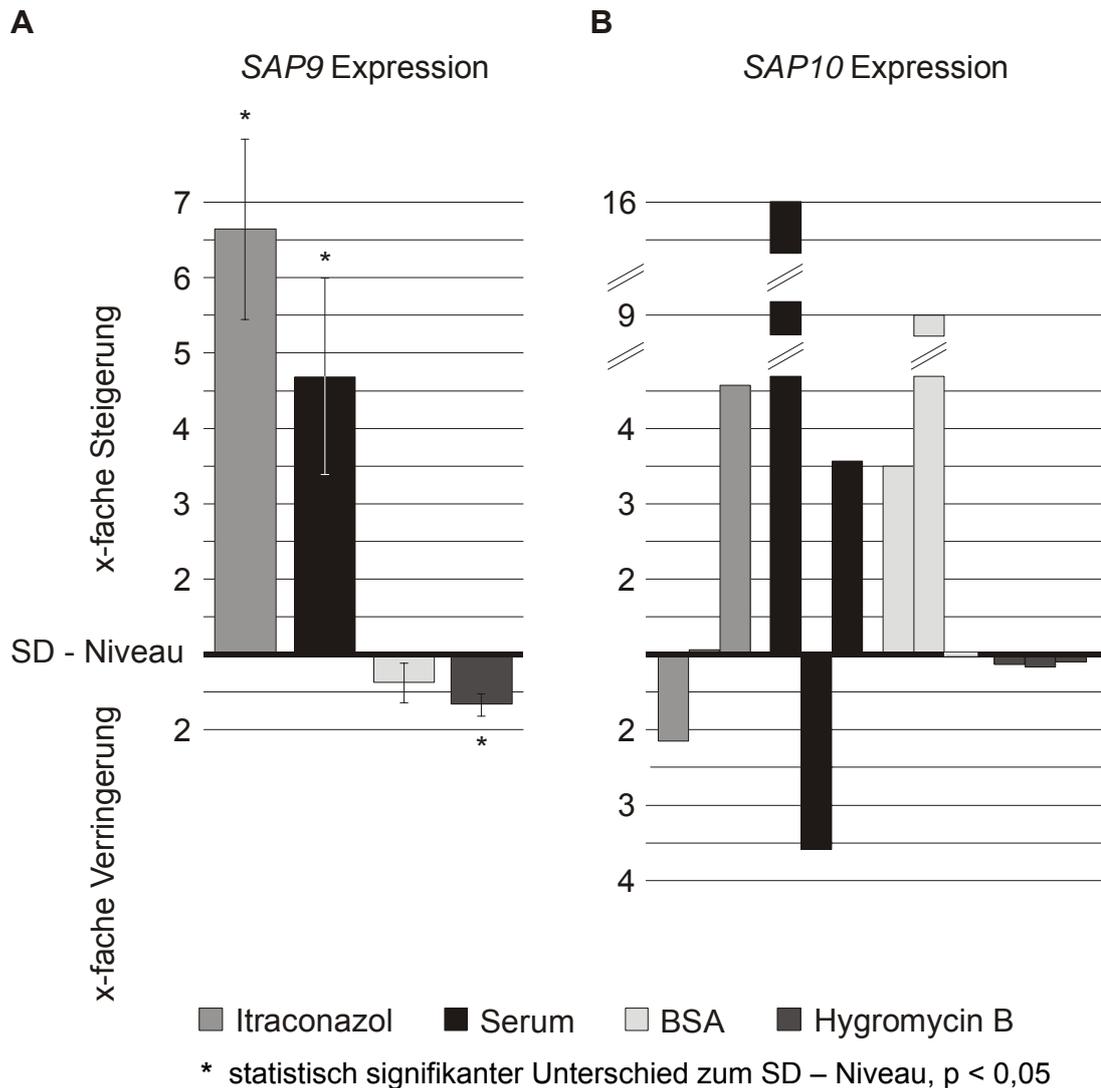
#### III.19.1.1. Signifikante Expressionssteigerung von *SAP9*

Bei Betrachtung des Expressionsniveaus des *SAP9* Gens in SD Medium im Vergleich zu den verschiedenen Anzuchtmedien sind zum Teil deutliche Unterschiede zu erkennen (Abb. 30A). Sowohl die Zugabe von Itraconazol (blockiert die Ergosterolsynthese) (6,65-fach  $\pm$  1,20) als auch das hypheninduzierende Serum (4,69-fach  $\pm$  1,35) riefen eine deutliche Steigerung der *SAP9* Genexpression hervor. Dies ging mit den vorangegangenen Ergebnissen einher, welche Sap9 eine Rolle bei der Strukturierung der Zelloberflächenintegrität zuwiesen. Das als Substrat von Sap2 bekannte BSA hatte auf die *SAP9* Expression keinen signifikanten Einfluss (1,04-fache Steigerung  $\pm$  0,26). Dafür sprachen auch die Untersuchungen zur Substratspezifität, welche die Hydrolyse von BSA durch Sap9 ausschließen, wodurch anzunehmen war, dass kein direkter oder indirekter funktioneller Zusammenhang zwischen der BSA Hydrolyse und der *SAP9* Expression besteht. Interessant war das geringe Absinken der *SAP9* Genexpression bei der Anzucht mit dem Proteinsyntheseinhibitor Hygromycin B (1,65-fach  $\pm$  0,15). Aufgrund der Wachstumsminderung der  $\Delta sap9$  Mutante in Anwesenheit von Hygromycin B (siehe III.9) wurde hier, ähnlich der Anzucht in dem Itraconazol – enthaltenden Medium, eine Expressionssteigerung erwartet.

### III.19.1.2. Unbeständige Expression von *SAP10*

Im Gegensatz zu *SAP9* traten bei der Expression des *SAP10* Gens deutliche Schwankungen innerhalb der drei biologischen Wiederholungen auf, wodurch eine signifikante Aussage nicht möglich ist. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 30B die biologischen Wiederholungen nicht zusammengefasst, sondern einzeln dargestellt. Bei der Anzucht von *C. albicans* in Medium mit Itraconazol ist in Abhängigkeit von der biologischen Wiederholung eine zweifache (2,14-fache) Expressionsverringeringung als auch eine fünffache (4,56-fache) Expressionssteigerung, sowie eine nahezu gleich bleibende Expression (1,03-fache Steigerung) gegenüber der Anzucht in SD Medium gemessen worden. Ähnliches gilt für das Expressionsverhalten in Serum Medium, welches Schwankungen von 16-facher Steigerung bis vierfacher Verringerung aufwies (3,57-fache und 15,98-fache Steigerung; 3,58-fache Verringerung). Die *SAP10* Expression war unter BSA Anzuchtbedingungen in keiner der drei Wiederholungen verringert, wobei auch hier deutliche Schwankungen auftraten, welche von einer gleich bleibenden Expression bis zu einer neunfachen Steigerung reichten (1,00-fache; 3,50-fache; 9,00-fache). Nur bei der Anzucht in Medium mit Hygromycin B wurden keine großen Schwankungen in der *SAP10* Expression gemessen. Ähnlich wie bei *SAP9* war eine leichte Expressionsverringeringung (1,12-fach; 1,16-fach; 1,10-fach) zu beobachten.

Eine signifikante Erhöhung der *SAP9* Genexpression bei der Anzucht in Medium mit Itraconazol oder Serum untermauert die Bedeutung dieses Gens für die Integrität der Zelloberfläche. Die starken Schwankungen innerhalb der Expression von *SAP10* deuten auf eine äußerst sensible Regulation und / oder eine transient variierende Expression dieses Gens unter bestimmten Anzuchtbedingungen.



**Abbildung 30. Quantitative Bestimmung der *SAP9* und *SAP10* Expression**

Mit Hilfe der Real Time TaqMan™ PCR erfolgte die quantitative Messung der Transkriptmenge der Gene *SAP9* und *SAP10* innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase in verschiedenen Anzuchtmedien. Als Vergleich diente das Expressionsniveau in SD Medium.

Die Expression des *SAP9* Gens wies eine signifikante Steigerung in den Itraconazol – oder Serum – enthaltenden Medien auf. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Hygromycin B zu einer signifikanten Verringerung der *SAP9* Transkriptmenge. Die Anzucht in BSA Medium wies keine signifikanten Unterschiede zur Anzucht in SD Medium auf. Die Expression des *SAP10* Gens war in fast allen getesteten Medien starken Schwankungen unterlegen, weshalb keine statistische Auswertung durchgeführt wurde. Einzige Ausnahme war die Anzucht in Hygromycin B – enthaltendem Medium, bei dem die *SAP10* Transkriptmenge annähernd dem Niveau des SD Mediums entsprach.

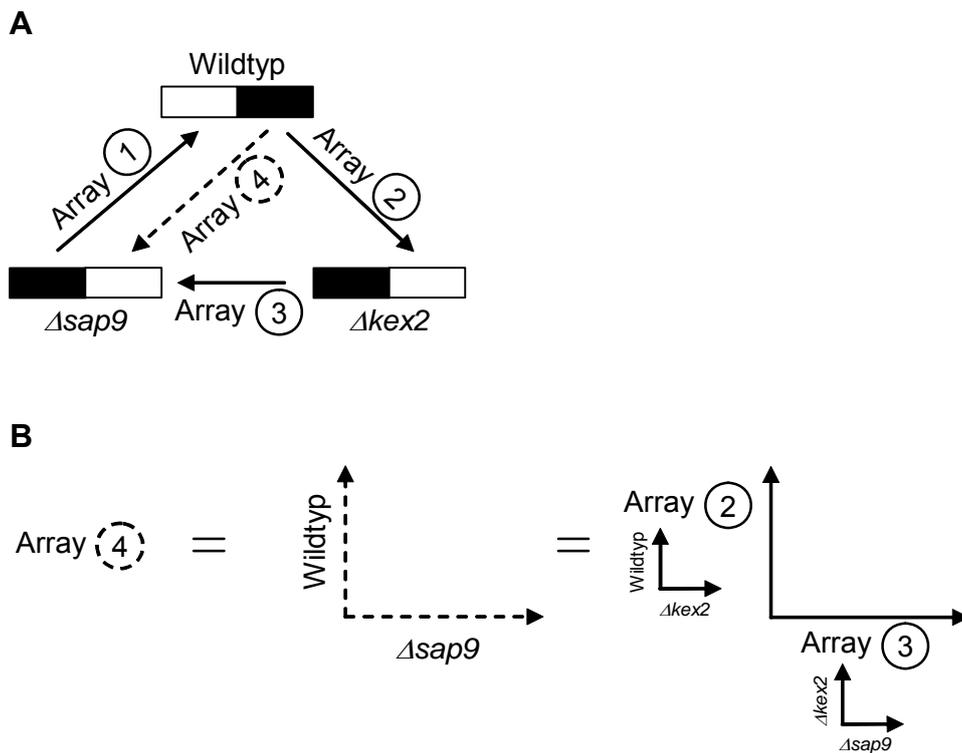
### **III.20. Expression von *SAP9* in den Mutanten $\Delta kex2$ und $\Delta sap10$ sowie von *SAP10* in den Mutanten $\Delta kex2$ und $\Delta sap9$**

Untersuchungen zur Substratspezifität der Proteasen Sap9 und Sap10 zeigten, dass aufgrund ähnlicher Prozessierungsmuster eine überlappende Funktion der beiden Aspartatproteasen untereinander, als auch mit der Kex2 Protease des Golgi Apparates möglich ist (III.16). Die Verwendung von Überexpressionsstämmen unterstützte diese Vermutung nur zum Teil (III.17). Es bestand weiterhin die Möglichkeit, dass auch andere Gene überlappende Funktionen haben, die auf transkriptionaler Ebene sichtbar sein könnten. Ein Vergleich der Transkriptionsprofile der einzelnen Stämme sollte daher mit Hilfe der Mikroarray Technik durchgeführt werden.

#### **III.20.1. Erhöhte Transkription der Gene *SAP9* und *SAP10* in den $\Delta kex2$ , $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ Mutanten**

Die Mikroarray Technik ermöglicht den Vergleich verschiedener Transkriptionsprofile. Die hier eingesetzten Arrays (Eurogentec) basieren auf gespotteten PCR Produkten, welche das komplette Genom von *C. albicans* umfassen. Bei den zu untersuchenden Stämmen handelt es sich um die Protease – Einzelmutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta kex2$  sowie um den Wildtyp CAI4. Nach Anzucht bis zur mittleren logarithmischen Phase wurde die RNA von je zwei Stämmen isoliert und in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die cDNA mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert (pro Stamm ein Farbstoff) und für eine Hybridisierung auf einem Mikroarray eingesetzt. Um mögliche Farbstoff – bedingte Unterschiede auszuschließen, wird die Wiederholung des jeweiligen Experiments mit entgegengesetzten Markierungen empfohlen. Wegen des hohen finanziellen Aufwands dieser Wiederholungen, wurde in dieser Arbeit jedoch darauf weitgehend verzichtet. Stattdessen wurden normalisierte Arrayergebnisse der entsprechenden

Farbstoffmarkierungen in einem theoretischen Experiment miteinander verglichen. So konnten zum Beispiel markierungsspezifische Variationen bei dem Vergleich der Daten für die  $\Delta sap9$  Mutante mit denen des Wildtyps aus dem Vergleich der Daten des Wildtyps mit denen der  $\Delta kex2$  Mutante und gleichzeitigem Vergleich der Daten der  $\Delta kex2$  Mutante mit denen der  $\Delta sap9$  ermittelt werden (Abb. 31).



### Abbildung 31 Theoretische Durchführung eines Mikroarrays

Zur Minimierung des finanziellen Aufwandes wurden die, aufgrund der Farbstoff – bedingten Schwankungen nötigen experimentellen Wiederholungen zum Teil nur theoretisch durchgeführt.

(A) Normalisierte Daten der durchgeführten Mikroarrays (Array 1 bis 3) wurden für die Analyse der nur theoretisch ausgeführten Mikroarrays (z.B. Array 4) genutzt.

(B) Array 4 (Wildtyp /  $\Delta sap9$ ) ergab sich aus dem theoretisch durchgeführten Experiment Array 2 / Array 3. Wobei die normalisierten Werte von Array 2 (Wildtyp /  $\Delta kex2$ ) und Array 3 ( $\Delta kex2$  /  $\Delta sap9$ ) eingesetzt wurden.

Die Untersuchung der Transkriptionsprofile der genannten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erbrachte weitere Hinweise auf eine teilweise überlappende Funktion der Proteine Sap9 und Sap10 untereinander als auch mit der Protease Kex2. Die Expressionsstärke der Gene *SAP9* und *SAP10* war in der  $\Delta kex2$  Mutante um das 1,5- bzw. 1,7-fache erhöht. Eine zweifache Erhöhung der Genexpression, wurde für *SAP9* in der  $\Delta sap10$  Mutante und für *SAP10* in der  $\Delta sap9$  Mutante analysiert. Der Anstieg der jeweiligen Genexpression als Folge des Verlustes eines anderen Gens kann auf überlappende Funktionen der Genprodukte zurückgeführt werden. Es ist aber ebenso möglich, dass es sich um eine kompensatorische Hochregulation ohne direkte funktionelle Überlappung handelt.

### **III.20.2. Bestätigung der Mikroarray Ergebnisse mit Hilfe der Real Time TaqMan™ PCR**

Mit Hilfe der Mikroarray Technologie gewonnenen Daten der erhöhten Expression der Proteasegene *SAP9* und *SAP10* in der  $\Delta kex2$  Mutante bzw. von *SAP9* in der  $\Delta sap10$  und von *SAP10* in der  $\Delta sap9$  Mutante sollten mit Hilfe der Real Time TaqMan™ PCR überprüft werden.

Wie bereits unter III.19 erläutert, ermöglicht die Real Time TaqMan™ PCR eine quantitative Messung des PCR Produkts während der Amplifikation. Zur Bestimmung der Expressionsstärke der Gene *SAP9* und *SAP10* wurde RNA innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase aus den zu untersuchenden Protease – Einzelmutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta kex2$  sowie dem Wildtyps CAI4 isoliert. Die Amplifikation erfolgte unter Einsatz der bereits unter III.19 beschriebenen Primerpaare, Sonden und Standardreihen.

Wie bei den Ergebnissen der Mikroarray Analyse, wurde mit der Real Time TaqMan™ PCR ein ähnliches Expressionsprofil der untersuchten *SAP* Gene in den verschiedenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Die Expression von *SAP9* lag in der  $\Delta kex2$  Mutante und in der  $\Delta sap10$  Mutante zweifach erhöht vor. Das *SAP10* Gen war in der  $\Delta sap9$  Mutante vierfach

verstärkt exprimiert. Damit konnte ein ähnliches Expressionsmuster der Mikroarray Untersuchungen bestätigt werden.

Somit deuten also Transkriptionsprofiluntersuchungen der Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  und  $\Delta kex2$  im Vergleich zum Wildtyp auf vorhandene überlappende Funktionen der Proteasen bzw. kompensatorische Expressionssteigerungen innerhalb der einzelnen Mutanten.

### **III.21. Vergleich der Transkriptionsprofile der Mutanten $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ mit dem des Wildtyps**

Wie bereits unter III.20 erläutert, wurde die Mikroarray Technik zur Untersuchung der Einzelmutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  herangezogen. Dabei konnte unter anderem die erhöhte Expression von *SAP9* in der  $\Delta sap10$  Mutante und des *SAP10* Gens in der  $\Delta sap9$  Mutante nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte das genomweite veränderte Transkriptionsprofil der beiden Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp anhand der gewonnenen Daten betrachtet werden.

#### **III.21.1. Unterschiedliche Transkriptionsprofile der $\Delta sap9$ und $\Delta sap10$ Mutante**

Die Deletion der Proteasegene *SAP9* oder *SAP10* bewirkte eine Änderung des Transkriptionsprofils, wodurch über 150 Gene in den jeweiligen Einzelmutanten eine mindestens zweifach erhöhte Expression gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Bei diesen Genen handelte es sich zu zirka 55% ( $\Delta sap9$ ) bzw. 35% ( $\Delta sap10$ ) um IPFs (Identified Protein Files) mit noch unbekannter Funktion. Dies entspricht dem ungefähren Durchschnitt der

IPFs mit unbekannter Funktion im gesamten *C. albicans* Genom, mit einem Anteil von zirka 40%.

Unter den 20 Genen, bei denen aufgrund der *SAP9* Deletion die stärkste Expressionserhöhung beobachtet wurde, ist ein überdurchschnittlich hoher Anteil (70%) von Genen mit unbekannter Funktion (Tab. 12). Da die abgeleiteten Proteinsequenzen einiger dieser Gene jedoch potentielle Motive und / oder schwache Homologien zu Proteinen von *S. cerevisiae* hatten, ließen sich diesen Genprodukten putative Eigenschaften oder Funktionen zuordnen (*Candida* DB, *Saccharomyces* GD). Werden diese Informationen einbezogen, treten unter den 20 Genen mit erhöhter Expression in der  $\Delta sap9$  Mutante neben wenigen Genprodukten mit verschiedenen Wirkungsbereichen bemerkenswert viele membranassoziierte Proteine auf (Tab. 12). Dies könnte auf eine mögliche kompensatorische Antwort auf die fehlende prozessierende Aktivität des Sap9 Proteins innerhalb der Zelloberfläche hindeuten. Somit wäre auch auf transkriptionaler Ebene die Bedeutung von Sap9 für die Integrität der Zelloberfläche zu erkennen.

**Tabelle 12. Namen und mögliche Funktionen der zwanzig Gene, welche als Folge der Deletion des *SAP9* Gens die höchsten Expressionssteigerungen aufweisen**

Genname	Expressionssteigerung	t- Test P- Value	Funktion (Angaben der CandidaDB)	Informationen aufgrund der Sequenz bzw. schwacher Homologie zu <i>S. c.</i>
<i>IPF17706</i>	18 -fach	0,010	unbekannt	hypothetischer ORF
<i>PIK1</i>	14	0,012	Phosphatidylinositol 4- Kinase	
<i>IPF9851</i>	11	0,022	unbekannt	Mating Type Regulationsprotein
<i>IPF7459</i>	9	0,014	unbekannt	putatives Membranprotein
<i>IPF4299</i>	8	0,032	unbekannt	GPI verankertes Protein (De Groot <i>et al.</i> , 2003)
<i>IPF10262</i>	7	0,032	unbekannt	putatives Membranprotein
<i>IPF17417</i>	7	0,050	unbekannt	Membranprotein, Multidrug Efflux Pumpe
<i>CHA12</i>	6	0,049	L-Serin / L-Threonin Deaminase	
<i>IPF13290</i>	6	0,072	unbekannt	mitochondriales Protein der tRNA Synthetase
<i>POX18</i>	6	0,094	Lipid – Transfer Protein	
<i>IPF14968</i>	6	0,023	unbekannt	keine Homologie vorhanden
<i>IPF3535</i>	5	0,086	unbekannt	putatives Membranprotein
<i>IPF20118</i>	5	0,026	unbekannt	Flavohemoglobin
<i>IPF1065</i>	5	0,080	unbekannt	Membranprotein, Triacetylfusarinine C Transporter
<i>IPF6380</i>	5	0,035	unbekannt	hypothetischer ORF
<i>IFO3</i>	5	0,095	putative Hydrolase	
<i>CRH11</i>	5	0,045	putatives Membranprotein	
<i>IPF407</i>	5	0,040	unbekannt	hypothetischer ORF
<i>IPF14119</i>	4	0,062	unbekannt	Glycoamylase
<i>APM3</i>	4	0,090	AP- 3 Komplex Untereinheit	

*S. c.* = *Saccharomyces cerevisiae*

Unter den, infolge der *SAP10* Deletion am stärksten exprimierten 20 Genen liegt der Anteil an IPFs unbekannter Funktion mit 40% im Bereich des genomischen Gesamtdurchschnitts (Tab. 13). Wie bereits bei Sap9 beschrieben, wurden auch hier Informationen aus der Proteinsequenz und Ähnlichkeiten dieser Sequenzen zu Proteinen von *S. cerevisiae* zur funktionellen Einordnung dieser Genprodukte genutzt. Im Gegensatz zum Transkriptionsprofil der  $\Delta sap9$  Mutante, ist für die  $\Delta sap10$  Mutante kein eindeutiger Zusammenhang mit der Zelloberflächenintegrität auf transkriptionaler Ebene zu erkennen. Nur einige Gene, wie zum Beispiel *IPF6332*, dessen Produkt an der Chitinbiosynthese beteiligt ist, können damit in Verbindung gebracht werden. Auffällig ist das Vorhandensein mehrerer an der RNA Regulation beteiligter Genprodukte, wie zum Beispiel des RNA Polymerase I Transkriptionsfaktors, der RNA Polymerase I, eines RNA Supressors und ähnlicher Proteine (Tab. 13). Bezüglich dieser Proteine kann kein direkter Zusammenhang zur bisher identifizierten Funktion der Protease Sap10 hergestellt werden (Tab. 13). Es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei um eine indirekte Antwort auf die *SAP10* Deletion über mehrere, verschieden verzweigte Signalwege handelt.

**Tabelle 13. Namen und mögliche Funktionen der zwanzig Gene, welche als Folge der Deletion des *SAP10* Gens die höchsten Expressionssteigerungen aufweisen**

Genname	Expressionssteigerung	t- Test P- Value	Funktion (Angaben der CandidaDB)	Informationen aufgrund der Sequenz bzw. schwacher Homologie zu <i>S. c.</i>
AOX2	62 -fach	0,001	Alternative Oxidase	
IPF7393	20	0,010	unbekannt	Zinkfinger Protein
MET1	17	0,013	Siroheme Synthase	
RPA12	14	0,008	DNA- directed RNA Polymerase I	
IPF8374	13	0,009	unbekannt	hypothetischer ORF
IPF7721	13	0,015	unbekannt	Transkriptionsaktivator der Lysin Biosynthesegene
IPF7631	12	0,010	unbekannt	Hsp40 Chaperon
RRP1	11	0,025	Prozessierung von rRNA Vorläufern	
SRP40	9	0,050	RNA I und II Supressor	
RRN3	8	0,064	RNA Polymerase I Transkriptionsfaktor	
IPF5533	8	0,018	ABC Transporter	
IPF11270	7	0,021	unbekannt	Kernprotein
IPF2093	7	0,048	Nuklearprotein unbekannter Funktion	
IPF16269	6	0,043	unbekannt	Komplexbildung mit Cef1 (Splicing Faktor)
IPF8661	6	0,034	unbekannt	assoziiert mit dem 26 S Proteasom
IPF447	6	0,053	unbekannt	Ribosom- Biogenese
IPF6332	6	0,030	Chitin Biosynthese Protein	
IPF10391	6	0,028	ähnlich dem DnaJ Protein	
IPF4719	6	0,027	Transkriptionsfaktor für Mating	
IMH3	6	0,041	IMP Dehydrogenase	

*S. c.* = *Saccharomyces cerevisiae*

### III.21.2. Erhöhte Expression einiger identischer Gene in der $\Delta sap9$ und der $\Delta sap10$ Mutante

Die Gegenüberstellung der Transkriptionsprofile der beiden Einzelmutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  zeigt, dass nur eine geringe Anzahl von Genen in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert vorliegt. Von den jeweils 150 Genen, welche in den Mutanten eine mindestens zweifach erhöhte Expression aufweisen, sind nur sieben Gene identisch. Dabei handelt es sich um die Gene einer Citratsynthase (*SIT1*), einer L-Serin / L-Threonin Deaminase (*CHA12*), sowie um fünf IPFs mit unbekannter Funktion. Aufgrund vorhandener Sequenzhomologien sowie weiterer Informationen der *C. albicans* (Candida DB) – und *S. cerevisiae* (SGB) – Datenbanken lassen sich potentielle Eigenschaften dieser IPFs ableiten (Tab. 14).

Bei Betrachtung der sieben, in beiden Mutanten hochregulierten Gene, wird die, in vorangegangenen Experimenten postulierte Bedeutung der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 für die Integrität der Zelloberfläche durchaus bestätigt. Die erhöhte Expression dreier putativer Membranproteine könnte eine kompensatorische Antwort auf fehlende oder nicht korrekt prozessierte Proteine innerhalb der Zelloberfläche der Einzelmutanten widerspiegeln. Das hochregulierte Genprodukt des *IPF7393* ist möglicherweise am Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat beteiligt, einem Teilabschnitt, den sekretorische Proteine während ihrer Prozessierung durchlaufen. Somit könnte auch hier ein funktioneller Zusammenhang mit den Proteasen Sap9 und Sap10 bestehen. Über eine Beziehung zwischen der fehlenden Sap9 und Sap10 Aktivität und der Citratsynthase oder der am Aminosäuremetabolismus beteiligten L-Serin / L-Threonin Deaminase lässt sich nur spekulieren.

Hervorzuheben ist das noch unbekanntes Gen *IPF4876*, welches kein Ortholog in *S. cerevisiae* besitzt und daher für weitere Untersuchungen ebenfalls von Interesse ist.

**Tabelle 14. Gene, welche sowohl in der  $\Delta sap9$  als auch in der  $\Delta sap10$  Mutante stärker exprimiert vorliegen**

Genname	Funktion	Ortholog in <i>S. cerevisiae</i>
<i>IPF7393</i>	unbekannt	Transport vom ER zum Golgi
<i>CHA12</i>	L-Serin / L-Threonin Deaminase	
<i>IPF10138</i>	unbekannt (putatives Membranprotein)	hypothetischer ORF
<i>CIT1.exon2</i>	Citratsynthase	
<i>IPF6380</i>	unbekannt	hypothetischer ORF
<i>IPF10262</i>	unbekannt (putatives Membranprotein)	Aktin / Zytoskelet Organisation
<i>IPF4876</i>	unbekannt (putatives Membranprotein)	nicht vorhanden

Der Vergleich der Transkriptionsprofile der Einzelmutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  mit dem Wildtypstamm unterstreicht die Bedeutung der beiden Proteasen für die Integrität der Zelloberfläche. Als mögliche kompensatorische Antwort auf die jeweilige Deletion von *SAP9* und *SAP10* liegen Gene, deren Produkte am Aufbau der Zelloberfläche beteiligt sind, in beiden Mutanten verstärkt exprimiert vor.

### III.22. Mögliche weitere Mitglieder der *SAP* Familie

Die Familie der sekretorischen Aspartatproteasen von *C. albicans* umfasst derzeit zehn Mitglieder. Hube *et al.* präsentierten 1991 die erste Sequenz eines *SAP* Gens (*SAP1*) (Hube *et al.*, 1991). Im Jahre 2000 wurde das bisher letzte Mitglied, *SAP10* (Accession Number AF146440), identifiziert. Das Vorhandensein weiterer, dieser Familie angehörender Proteasen kann nicht ausgeschlossen werden. Da die gesamte Genomsequenz von *C. albicans* bekannt und durch die Datenbank '*Candida* DB' öffentlich zugänglich ist (d'Enfert *et al.*, 2005), können aufgrund von Sequenzanalysen mögliche weitere sekretorische Aspartatproteasen identifiziert werden.

### III.22.1. *In silico* Analyse des *Candida albicans* Genoms

Zur Identifizierung von Genen für putative sekretorische Aspartatproteasen wurden die Proteinsequenzen der Aspartatproteasen Sap1 bis Sap10 einzeln gegen die Sequenzinformation der *C. albicans* Datenbank (*Candida* DB) verglichen (eingesetzte Software: NCBI BLAST Version 2, maximal 'Expect Value' = 9,8). Alle Proteine, die bei dieser Suche Ähnlichkeiten zu mindestens zwei Sap Proteinen aufwiesen, wurden für weitere Analysen in Betracht gezogen. Insgesamt konnten 17 Proteinsequenzen identifiziert werden, welche in der Tabelle 15 zusammengefasst sind.

**Tabelle 15. Proteine, deren Sequenzen zu mindestens zwei Sap Proteinen ähnlich sind**

Gen-Name	CA-Nummer	Funktion*	Ähnlichkeit zu Sap
<i>APR1</i>	CA4476	Protease der Vakuole	Sap1 bis Sap10
<i>IPF1183</i>	CA4816	putative Aspartatprotease <sup>#</sup>	Sap1 bis Sap10
<i>IPF11977</i>	CA0771	putative Aspartatprotease <sup>#</sup>	Sap1 bis Sap10
<i>IPF14031</i>	CA0549	putative sekretorische Aspartatprotease <sup>#</sup>	Sap1 bis Sap10
<i>IPF6613</i>	CA1994	unbekannt	Sap1 bis 6 und 8
<i>IPF11607</i>	CA3189	unbekannt	Sap1, 2, 4 bis 6 und 8
<i>IPF8147</i>	CA0229	unbekannt	Sap1 bis 3
<i>IFF6</i>	CA1621	unbekannt	Sap7 und 8
<i>IPF10654</i>	CA3825	D-Arabinitol Dehydrogenase <sup>#</sup>	Sap1 und 2
<i>IPF15153</i>	CA0274	unbekannt	Sap1 und 6
<i>IPF16514</i>	CA1388	unbekannt	Sap3 und 5
<i>IPF4828</i>	CA2709	Transkriptionsfaktor RLM1 <sup>#</sup>	Sap4 und 6
<i>IPF7647</i>	CA1866	unbekannt	Sap1 und 3
<i>IPF8866</i>	CA0076	unbekannt	Sap7 und 8
<i>NUP85</i>	CA6152	Nuclear Pore Protein <sup>#</sup>	Sap4 und 6
<i>TIF3</i>	CA3754	Translations-Initiationsfaktor eIF4B <sup>#</sup>	Sap7 und 9
<i>UBP1</i>	CA5665	Ubiquitin-spezifische Protease <sup>#</sup>	Sap4 und 6

\* Angaben der CandidaDB

<sup>#</sup> Funktionsbestimmung aufgrund der Homologie zu *S. cerevisiae*

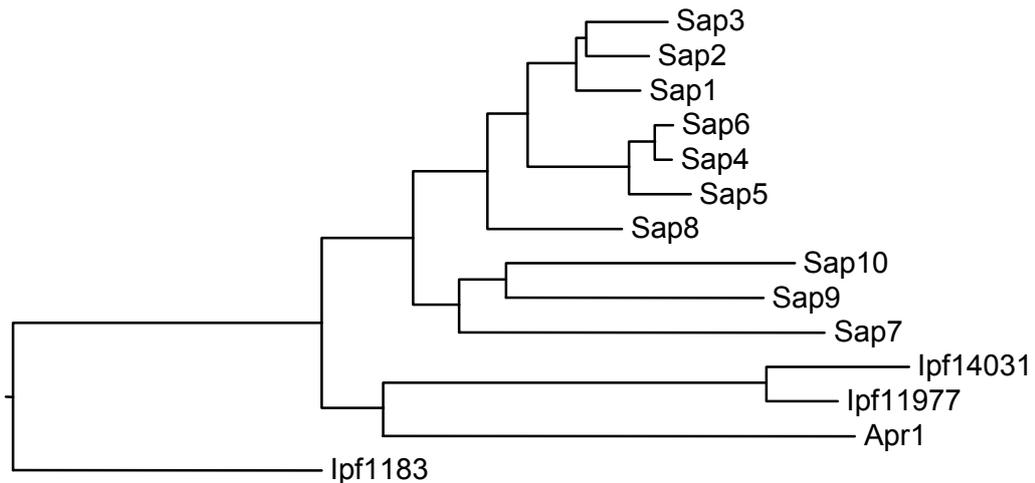
Zehn dieser 17 Proteine (Iff6, Ipf10654, Ipf15153, Ipf16514, Ipf4828, Ipf7647, Ipf8866, Nup85, Tif3, Ubp1) besitzen Sequenzähnlichkeiten zu jeweils zwei Mitgliedern der Sap Familie. Funktionsvoraussagen aufgrund von homologen Genen bzw. Proteinen in *S. cerevisiae* bescheinigen fünf dieser zehn Proteine (Ipf10654, Ipf4828, Nup85, Tif3, Ubp1) keine Aspartatprotease Aktivität. Die anderen fünf Proteinsequenzen sind bislang von unbekannter Funktion.

Jeweils ein Protein ist zu drei (Ipf8147), sechs (Ipf11607) oder sieben (Ipf6613) Sap Familienmitgliedern ähnlich. Die Funktion dieser drei Proteine ist zurzeit noch unbekannt.

Die restlichen vier Proteinsequenzen (Apr1, Ipf1183, Ipf11977, Ipf14031) weisen Ähnlichkeiten zur gesamten Familie der sekretorischen Aspartatproteasen auf. Bei Apr1 handelt es sich um eine bereits bekannte Aspartatprotease der Vakuole (homolog zu der Proteinase A von *S. cerevisiae*) (Cannon *et al.*, 1992). Den anderen drei Proteinen wird aufgrund der Homologie zu entsprechenden Proteinen von *S. cerevisiae* eine mögliche Funktion als Aspartatprotease zugeschrieben.

### **III.22.2. IPF14031 als putatives Mitglied der SAP Familie**

Zu den charakteristischen Eigenschaften aller Mitglieder der Sap Familie gehören die beiden Aspartatreste im katalytischen Zentrum dieser Proteasen. Die Sequenzanalyse der 17, durch den Blast identifizierten Proteine zeigt, dass nur vier Proteine (Apr1, Ipf1183, Ipf11977, Ipf14031) über dieses Charakteristikum verfügen. Dabei handelt es sich um die vier Proteine, welche zu allen zehn Mitgliedern der Sap Familie ähnlich sind.



**Abbildung 32. Dendrogramm der Sap Familie und vier Sap – ähnlicher Proteinsequenzen**

Das Sequenzalignment der verschiedenen Proteine zeigt, dass sich die vier Proteine (Apr1, Ipf1183, Ipf11977, Ipf14031), welche in ihrer Sequenz den Mitgliedern der Sap Familie ähneln, in keine Untergruppe direkt eingliedern.

Das Dendrogramm (Abb. 32) des Sequenzalignments der Saps und der vier Proteine Apr1, Ipf1183, Ipf11977, Ipf14031 macht deutlich, dass sich keines dieser Genprodukte direkt in die Untergruppen der zehn Sap Proteine einreicht. Die Proteinsequenz des Ipf1183 zweigt bereits sehr früh von den anderen Sequenzen des Alignments ab, so dass eine Zugehörigkeit zu der Sap Familie als eher unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Weitere Merkmale der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen umfassen das Vorhandensein eines Signalpeptides, von Lysin / Arginin (KR) bzw. Lysin / Lysin (KK) Sequenzen als mögliche Prozessierungsstellen der Kex2 Protease im Golgi Apparat, sowie von vier Cysteinresten für die Ausbildung von Disulfidbrücken. Die Sequenzen der vier Proteine Apr1, Ipf1183, Ipf11977, Ipf14031 wurden auf diese Eigenschaften hin untersucht. Die Voraussage eines möglichen Signalpeptides erfolgte mit Hilfe des öffentlich zugänglichen Softwareprogramms 'SignalP' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), welches zwei Methoden zur Signalpeptidvoraussage umfasst: SignalP-NN (basiert auf neuronalen Netzwerken) und SignalP-HMM (basiert auf dem Hidden Markov Modell) (Bendtsen *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 1997). Demnach wird für drei der vier

Proteinsequenzen (Apr1, Ipf1183, Ipf14031) ein Signalpeptid vorausgesagt. Die Mitglieder der Sap Familie besitzen als mögliche Prozessierungsstelle des Kex2 Enzyms mindestens eine KR – oder KK – Sequenz im N- terminalen Bereich der Proteine (Propeptid). Die Proteinsequenz des Apr1 beinhaltet eine KK – Sequenz, wohingegen Ipf14031 eine und Ipf11977 zwei KR – Sequenzen im N- terminalen Bereich aufweisen. Nur die Proteinsequenz des Ipf1183 besitzt keine dieser beiden Prozessierungsstellen.

Die für die Ausbildung von zwei Disulfidbrücken nötigen vier Cysteinreste sind in allen Sap Proteinsequenzen sowie in Apr1, Ipf14031 und Ipf11977 an ähnlichen Positionen vorhanden. Ipf1183 besitzt hingegen nur zwei Cysteinreste, wodurch die Ausbildung beider Disulfidbrücken nicht möglich ist.

Eine Zusammenstellung der untersuchten Eigenschaften im Vergleich zu den Mitgliedern der Sap Familie bietet die Tabelle 16. Die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zu allen zehn Saps und ihrer Aspartatreste ausgewählten vier Proteinsequenzen Apr1, Ipf1183, Ipf11977, Ipf14031 können nicht alle als mögliche weitere Mitglieder der Familie der sekretorischen Aspartatproteasen betrachtet werden. Bei Apr1 handelt es sich um eine bereits beschriebene Aspartatprotease der Vakuole. Das Genprodukt des *IPF1183* enthält keine KR – oder KK – Sequenz und kann aufgrund nur eines Cysteinrestes keine Disulfidbrücken ausbilden. Somit fehlen dieser Proteinsequenz bereits zwei charakteristische Merkmale der sekretorischen Aspartatproteasen. Ipf11977 besitzt im Gegensatz zu den Saps kein putatives Signalpeptid, wodurch dessen Zuordnung zu dieser Familie aufgrund der gegebenen Definitionen nicht sinnvoll ist. Nur Ipf14031 kann alle, hier beschriebenen charakteristischen Sequenzmerkmale der Sap Familie aufweisen und somit als mögliches vorerst letztes Mitglied der sekretorischen Aspartatproteasen bezeichnet werden.

**Tabelle 16. Charakteristische Eigenschaften der Protease Apr1 und der drei Proteinsequenzen, welche zu allen Mitgliedern der Sap Familie ähnlich sind**

Gen-Name	Funktion*	Aspartatreste DTG / DSG	Signal- peptid	KR / KK Schnittstellen	Cystein- reste
<i>SAP1</i> bis <i>SAP10</i>	sekretorische Aspartatproteasen	NH <sub>3</sub> -...DTG...D[T/S]G...-COOH	ja	mindestens eine KR oder KK	4
<i>APR1</i>	Protease der <u>Vakuole</u>	NH <sub>3</sub> -...DTG...DTG...-COOH	ja	KK <sub>88</sub>	4
<i>IPF1183</i>	putative Aspartatprotease <sup>#</sup>	NH <sub>3</sub> -...DSG...DTG...-COOH	ja	<u>keine</u>	<u>2</u>
<i>IPF14031</i>	putative sekretorische Aspartatprotease <sup>#</sup>	NH <sub>3</sub> -...DTG...DTG...-COOH	ja	KR <sub>41</sub>	4
<i>IPF11977</i>	putative Aspartatprotease <sup>#</sup>	NH <sub>3</sub> -...DTG...DTG...-COOH	<u>nein</u>	KR <sub>13</sub> und KR <sub>84</sub>	4

\* Angaben der CandidaDB

<sup>#</sup> Funktionsbestimmung aufgrund der Homologie zu *S. cerevisiae*  
Unterschiede zu den Mitgliedern der Sap Familie sind unterstrichen