

## IV. Diskussion

### IV.1. Putative Bindestellen von Transkriptionsfaktoren und deren Einfluss auf die Expression der *SAP* Gene von *Candida albicans*

#### IV.1.1. Putative Bindestellen von Transkriptionsfaktoren innerhalb der Promotorregionen der *SAP* Gene

Der humanpathogene Pilz *C. albicans* verfügt über eine Reihe von Virulenzfaktoren, welche an der Interaktion mit dem Wirt beteiligt sind und die dem Pilz eine Besiedelung und Verbreitung innerhalb des Wirtes ermöglichen und / oder die Schädigungen des Wirtes verursachen. Die Aktivierung dieser Faktoren zu entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf einer Infektion kann entscheidenden Einfluss auf die Stärke der Wirtsschädigungen haben. Zu den Virulenzfaktoren zählt auch die Familie der sekretorischen Aspartatproteasen. Neben grundlegenden Aufgaben, wie der Nährstoffversorgung spielen sie bei der Interaktion mit dem Wirt durch Hydrolyse von Wirtsproteinen eine entscheidende Rolle. Die Familie der sekretorischen Aspartatproteasen (Saps) besteht aus mindestens zehn Mitgliedern, wodurch eine funktionelle Spezialisierung der Saps vorstellbar ist (Naglik *et al.*, 2004). Analysen der Proteinsequenzen zeigten eine teilweise Gruppierung der Sap Proteine. Diese spiegelt sich in ähnlichen bzw. gleichen Funktionsbereichen der Saps einer jeweiligen Subgruppe wider (Naglik *et al.*, 2004). *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen der Genexpression und der Mutantenphänotypen sprechen ebenfalls für eine differenzielle Regulation der Expression der *SAP* Gene (Naglik *et al.*, 2004). Sowohl die Induktion, als auch die Stabilität der RNA haben einen Einfluss auf die tatsächlich vorhandene Transkriptmenge. Zur Vereinfachung wird im Folgenden von der „Expression“ gesprochen.

Obwohl die Regulation der Genexpression bei eukaryontischen Zellen vielfältig ist und nicht nur auf den 5'-Bereich eines Gens reduziert ist, wird in diesem Bereich die Promotorregion und damit die maßgebliche Regulation der Transkription erwartet. Bei Untersuchungen der Promotorregionen der *SAP* Genfamilie war eine Gruppierung der Promotorsequenzen der Gene *SAP4* bis *SAP6* zu beobachten, was sich mit dem ähnlichen *in vitro* – und *in vivo* – Expressionsmuster der entsprechenden Gene bzw. deren Genprodukten deckt. Diese drei Gene besitzen einen sehr hohen Anteil (mindestens 77%) von identischen Sequenzbereichen, welcher sich bis über die Promotorregion erstreckt. Eine evolutionäre Entstehung dieser drei *SAP* Gene durch Duplikation und Mutationen eines gemeinsamen Vorläufers ist vorstellbar.

*In silico* Sequenzanalysen ermöglichen die Voraussage putativer Transkriptionsfaktorbindestellen. Bei solchen Analysen in den 5'-Bereichen der *SAP* Gene wurde die starke Sequenzähnlichkeit der Promotoren der Gene *SAP4* bis *SAP6* deutlich. In den überwiegenden Fällen handelte es sich um die gleichen Transkriptionsfaktoren (Cph1, Efg1, Gcn4, Nrg1 und Tec1), für die in diesen drei Promotorregionen putative Bindestellen existieren. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine, bereits früher vermutete Coregulation der Gene *SAP4* bis *SAP6* während der Hypheninduktion von *C. albicans* (Hube *et al.*, 1994; Sanglard *et al.*, 1997a). Eine Ausnahme bilden die Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Cap1 und Tup1. Putative Bindestellen für Cap1 sind in der Promotorregion des *SAP4* Gens und Erkennungssequenzen für Tup1 im Promotorbereich des *SAP5* Gens nicht vorhanden. Unter Annahme funktioneller Cap1 – und Tup1 – Bindestellen wäre daher eine unterschiedliche Expressionsregulation der, auf Sequenzebene fast identischen Proteasen Sap4 bis Sap6 möglich. Ein solches unterschiedliches Expressionsverhalten konnte für die Gene *SAP4* bis *SAP6* in einer  $\Delta$ *efg1* Mutante gezeigt werden. Dabei konnte für die Gene *SAP4* bis *SAP6* eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Expression nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* untereinander wurde jedoch eine stärkere Repression der Gene *SAP4*

und *SAP6* im Gegensatz zu dem Gen *SAP5* deutlich. Semiquantitative Untersuchungen der Mutanten  $\Delta cap1$  und  $\Delta tup1$  wiesen hingegen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp in der Expression der *SAP* Gene auf. Eine tatsächliche Beteiligung des Transkriptionsrepressors Tup1 an der Regulation der Gene *SAP4* und *SAP6* wurde in Mikroarray Analysen der  $\Delta tup1$  Mutante nachgewiesen (Murad *et al.*, 2001a). Interessanter Weise war bei diesen Untersuchungen eine Derepression in der  $\Delta tup1$  Mutante nicht nur für die Gene *SAP4* und *SAP6*, sondern auch für das *SAP5* Gen nachweisbar. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der drei Gensequenzen können Kreuzhybridisierungen, die das Ergebnis verfälschen würden, in diesem Fall jedoch nicht ausgeschlossen werden. Einen Beweis für die faktische Funktionalität der *in silico* identifizierten Tup1 Bindestelle innerhalb des Promotors des *SAP7* Gens liefert die Derepression von *SAP7* in einer  $\Delta tup1$  Mutante (Murad *et al.*, 2001a). Bindestellen des Transkriptionsfaktors Tec1 kommen nahezu ausschließlich in den Promotoren der Gene *SAP4* bis *SAP6* vor. Nur die Gene *SAP2* und *SAP8* besitzen jeweils eine mögliche Bindestelle innerhalb ihrer Promotorregion. Interessanter Weise befinden sich die jeweils drei vorhandenen putativen Tec1 Bindestellen innerhalb der 5'-Bereiche der Gene *SAP4* bis *SAP6* in den meisten Fällen in identischen Abständen zum Startcodon. Die ausbleibende Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* in einer  $\Delta tec1$  Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen (Schweizer *et al.*, 2000; Staib *et al.*, 2004) untermauert die Funktionalität dieser Bindestellen. Erkennungssequenzen des Transkriptionsfaktors Rlm1 sind in den Promotoren der Gene *SAP1* bis *SAP3* vorhanden. Diese Gene ähneln sich in ihrer Gen- und Protein-, aber nicht in ihrer Promotorsequenz. Aufgrund der Bedeutung der Gene *SAP1* bis *SAP3* für Oberflächeninfektionen, ist eine Coregulation dieser drei Gene denkbar. Es liegen jedoch keine *in vitro* Daten einer Rlm1-abhängigen Expression der Gene *SAP1* bis *SAP3* vor. Eine weitere putative Rlm1 Bindestelle befindet sich in dem Promotor des *SAP9* Gens. In *S. cerevisiae* ist der Transkriptionsfaktor Rlm1 ein Bestandteil des Zellwand-Integrität Signalweges (Garcia *et al.*, 2004), sodass dessen Bindestelle im Promotor

des *SAP9* Gens mit der Bedeutung dieser Protease für die Integrität der Zelloberfläche im funktionellen Zusammenhang stehen kann. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, Gcn4 besitzt in den Promotoren aller Mitglieder der *SAP* Familie putative Bindestellen. Die hier gewählten Anzuchtbedingungen zeigten jedoch keine Auswirkungen einer *GCN4* Deletion auf die Expression der *SAP* Gene. Transkriptomuntersuchungen einer  $\Delta gcn4$  Mutante konnten ebenfalls keinen direkten Einfluss auf die *SAP* Genexpression nachweisen (Tournu *et al.*, 2005). Möglicherweise ist der Transkriptionsfaktor Gcn4 unter anderen Anzuchtbedingungen oder *in vivo* von Bedeutung, oder dessen Aktivitätsverlust kann durch andere Transkriptionsfaktoren kompensiert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den putativen Erkennungssequenzen um keine funktionellen Bindestellen handelt, und die Konsensussequenz genauer definiert werden müsste.

#### **IV.1.2. Die Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1 beeinflussen die Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* *in vitro***

Die generellen Transkriptionsfaktoren Cph1 und Efg1 der MAP – Kinase – sowie cAMP – Signaltransduktionswege sind unter anderem an der Hyphenausbildung von *C. albicans* beteiligt (Ernst, 2000; Niimi, 1996). *In silico* Untersuchungen der Promotorregionen der *SAP* Gene haben gezeigt, dass Erkennungssequenzen des Transkriptionsfaktors Cph1 in den Promotoren der hyphenassoziierten Gene *SAP4* bis *SAP6* und in dem Promotor des *SAP7* Gens vorhanden sind. Die Funktionalität der Cph1 Bindestellen innerhalb der Promotoren von *SAP4* bis *SAP6* konnte anhand von *in vitro* Expressionsstudien einer  $\Delta cph1$  Mutante nachgewiesen werden. Die Derepression der Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* in der  $\Delta cph1$  Mutante war jedoch von den gewählten Anzuchtbedingungen abhängig. In Lee's Medium fungierte Cph1 als Repressor der *SAP4* bis *SAP6* Expression, wohingegen in Serum Medium keine direkte Regulation durch Cph1 nachweisbar war. An der bereits bekannten Induktion der Gene *SAP4* bis

*SAP6* als Folge der serumbedingten Hypheninduktion (Hube *et al.*, 1994) sind demnach weitere bzw. andere Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die Notwendigkeit des Transkriptionsfaktors Cph1 für eine, dem Wildtyp entsprechende Hyphenausbildung war jedoch unter beiden hier gewählten Anzuchtbedingungen erkennbar. Eine völlige Blockierung der Hypheninduktion wurde als Folge der *CPH1* Deletion nicht beobachtet. Auch andere hypheninduzierende Anzuchtbedingungen bewirken kein totales Ausbleiben des Hyphenwachstums in einer  $\Delta cph1$  Mutante (Calderone, 2002), sodass der MAP – Kinase Signaltransduktionsweg mit dem Transkriptionsfaktor Cph1 an der Hyphenausbildung beteiligt aber nicht zwingend notwendig ist.

Im Gegensatz zu Cph1 war der Transkriptionsfaktor Efg1 unter den hier getesteten Anzuchtbedingungen für die Hypheninduktion essentiell. Putative Bindestellen des Efg1 befinden sich in allen Promotoren der *SAP* Gene. In den hypheninduzierenden Medien Lee's und Serum ist eine Expressionsregulation durch diesen Transkriptionsfaktor für die Gene *SAP4* bis *SAP6* aufgrund von Expressionsstudien einer  $\Delta efg1$  Mutante nachweisbar. Interessanter Weise konnten dem Efg1 Protein dabei Funktionen als Transkriptionsaktivator (Serum Medium) aber auch als Repressor (Lee's Medium) zugeschrieben werden. Darüber hinaus wurde eine *SAP4* bis *SAP6* Expression beobachtet, obwohl keine Hyphenbildung nachweisbar war. Somit kann die Regulation dieser Gene durch Efg1 von der Regulation der Morphologie abgekoppelt sein. Möglicherweise spielen weitere Transkriptionsfaktoren eine Rolle, welche einen Einfluss auf die Aktivität des Efg1 Proteins ausüben. So wird zum Beispiel die Repression der Hypheninduktion durch Efg1 während des Wachstums unter eingebetteten Bedingungen durch die Interaktion mit dem Zinkfinger Protein Czf1 aufgehoben (Giusani *et al.*, 2002). Darüber hinaus kann der Einfluss auf die Morphologie auch von der Expressionsstärke des *EFG1* Gens abhängen: beim phänotypischen "opaque" / "white" Switching führt ein starkes Expressionsniveau von *EFG1* zur Induktion der "white" Form, wohingegen ein geringes Expressionsniveau die Induktion der "opaque" Form zur Folge

hat (Sonneborn *et al.*, 1999). Für die duale Funktion des Efg1 Proteins während der Morphogenese ist somit neben dem Induktionssignal die abgestimmte Expressionsstärke bzw. Aktivität des Efg1 entscheidend (Stoldt *et al.*, 1997).

#### **IV.1.3. Der Transkriptionsfaktor Efg1 fungiert als Aktivator der SAP4 bis SAP6 Genexpression *in vivo***

Analysen der hyphendefizienten Transkriptionsfaktormutante  $\Delta efg1$  in Bezug auf die Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* sprachen bei einer intraperitonealen (i. p.) Infektion im Mausmodell für eine Funktion des Efg1 Proteins als Transkriptionsaktivator dieser Gene. Die Gewebeschädigung und Virulenz der  $\Delta efg1$  Mutante ist in diesem i. p. Mausmodell deutlich herabgesetzt (Felk *et al.*, 2002). Diese Beobachtung kann mit der fehlenden Hypheninduktion der  $\Delta efg1$  Mutante in Zusammenhang stehen. Weiterhin ist aber auch die ausbleibende bzw. reduzierte Expression der Gene *SAP4* bis *SAP6* von Bedeutung. Untersuchungen von hyphenbildenden Einzel – und Doppelmутanten dieser *SAP* Gene haben eine signifikante Verringerung der Gewebeschädigung bei fehlender Aktivität der Proteasen Sap4 bis Sap6, vor allem der Sap6 Protease nachgewiesen (Felk *et al.*, 2002).

#### **IV.2. Die Proteasen Sap9 und Sap10 aus *Candida albicans***

##### **IV.2.1. Sap9 und Sap10 unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der Sap Familie durch eine GPI Verankerung**

Ein Vergleich der einzelnen Proteinsequenzen der Sap Familie wies Unterschiede zwischen den beiden jüngsten Mitgliedern und der restlichen Familie auf. Im Gegensatz zu Sap1 bis Sap8 befindet sich innerhalb der

Proteinsequenz von Sap9 und Sap10 eine C-terminale, putative Konsensussequenz für eine GPI Verankerung. Bei der heterologen Expression wurden nur C-terminal verkürzte Konstrukte der Proteasen Sap9 und Sap10 in den Kulturüberstand sekretiert, was für eine tatsächliche Verankerung aufgrund der GPI Konsensussequenz dieser beiden Proteasen spricht.

Für die genaue Lokalisierung der Proteasen Sap9 und Sap10 in *C. albicans* wurden Gfp Fusionsproteine hergestellt. Mikroskopische Untersuchungen der Protease – Gfp – Fusionsstämme konnten jedoch keine Fluoreszenzen nachweisen. Dies kann wahrscheinlich auf eine Fehlfaltung des Gfp Proteins zurückgeführt werden, was wiederum als mögliche Folge der Protease – Gfp – Fusion denkbar ist. Es ist möglich, dass der Einbau einer längeren Linkersequenz die korrekte Faltung des Gfp begünstigt. Um jedoch keine erneute Klonierungen und Transformationen der entsprechenden Fusionsvektoren durchführen zu müssen, wurde zum Nachweis der Lokalisation der Gfp Fusionsproteinen ein Anti – Gfp Antikörper eingesetzt. Dieser erkennt unter Umständen auch nicht korrekt gefaltete Gfp Proteine. Unter Verwendung dieses Antikörpers zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, eine unterschiedliche Lokalisation der Sap9 – und Sap10 – Fusionsproteine innerhalb der Zelloberfläche. Dabei ist das Sap9 – Fusionsprotein vorrangig in der Plasmamembran und im Gegensatz dazu das Sap10 – Fusionsprotein auch in der Zellwand nachweisbar. Dies korreliert mit den Vorhersagen zur Lokalisation, welche auf Grundlage der Proteinsequenz getroffen werden können. Caro *et al.* postulieren eine Unterscheidung von GPI Proteinen der Plasmamembran und der Zellwand aufgrund eines dibasischen Aminosäuremotivs direkt stromaufwärts der Omegaposition (Caro *et al.*, 1997). Ein solches dibasisches Motiv ist in der Sap9 Proteinsequenz, jedoch nicht in der Proteinsequenz von Sap10 nachweisbar. Somit kann das Vorkommen des Sap9 – Fusionsproteins in der Plasmamembran sequenzspezifisch begründet werden und angenommen werden, dass dies auch bei dem nativen Sap9 Protein der Fall ist.

Aufgrund der GPI Verankerung ist ein, von den anderen Sap Familienmitgliedern abweichender Prozessierungsweg des Proenzym von Sap9 und Sap10 möglich. Der genaue Ablauf des Transports von GPI Proteinen ist noch nicht bekannt, es bestehen jedoch Hinweise, dass GPI Proteine im endoplasmatischen Retikulum in bestimmte Vesikel verpackt werden und auf einem separaten Transportweg zur Oberfläche gelangen (Frieman and Cormack, 2003; Muniz *et al.*, 2001). Infolge dieser verschiedenen Transportvarianten besteht die Möglichkeit, dass eine für Sap2 nachgewiesene (Newport and Agabian, 1997), und für die anderen Mitglieder der Sap Familie angenommene Prozessierung des Proproteins durch die im trans – Golginetzwerk lokalisierte Protease Kex2 bei Proproteinen von Sap9 und Sap10 nicht zutrifft. In diesem Fall muss angenommen werden, dass die Prozessierung von Sap9 und Sap10 durch Autokatalyse oder andere Proteasen erfolgt (siehe unten).

Infolge der GPI Verankerung ähneln Sap9 und Sap10 den Aspartatproteasen (Yapsinen) aus *S. cerevisiae* deutlich stärker als die anderen Mitglieder der Sap Familie aus *C. albicans*. Im Gegensatz zur Sap Familie sind alle Mitglieder der Yapsinfamilie GPI verankert (Krysan *et al.*, 2005). Ähnlich dem Verhalten der heterolog exprimierten Proteine Sap9 und Sap10 in *Pichia pastoris*, konnte auch für Yps1 und Yps2 eine Sekretion als Folge C- terminaler Sequenzdeletionen beobachtet werden (Olsen *et al.*, 1999).

#### **IV.2.2. Die N- Glykosylierung von Sap9 und Sap10 weicht von anderen Sap Proteinen ab**

Die GPI Verankerung ist nicht der einzige Unterschied zwischen den Aspartatproteasen Sap1 bis Sap8 und Sap9 oder Sap10. Die Yapsin – ähnlichen Proteasen weisen mit fünf bzw. acht putativen Konsensussequenzen für N- Glykosylierungen deutlich mehr N- Glykosylierungsstellen auf, als die Sequenzen der reifen Proteine Sap1 bis Sap8 mit maximal einer putativen N- Glykosylierungsstelle. Für die in



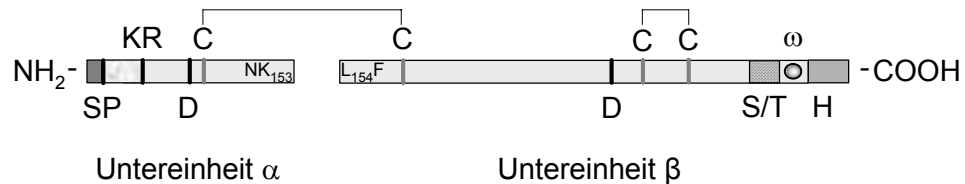
*P. pastoris* heterolog exprimierten Proteine Sap9 und Sap10 wurden in dieser Arbeit starke N- Glykosylierungen nachgewiesen. Obwohl es vorstellbar ist, dass die heterolog exprimierten Proteine in *P. pastoris* unterschiedlich glykosiliert vorliegen als in *C. albicans* ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass Sap9 und Sap10 aufgrund ihrer Oberflächenlokalisation auch in *C. albicans* glykosiliert sind, da eine Glykosylierung bei Zelloberflächenproteinen meist stärker ausgeprägt ist.

#### **IV.2.3. Sap9 besteht aus mehreren Untereinheiten und ist zur Selbstprozessierung befähigt**

Weitere Untersuchungen der Proteine Sap9 und Sap10 haben gezeigt, dass Sap9 unter denaturierenden Bedingungen aus zwei getrennten Untereinheiten besteht. Ähnliche Beobachtungen beschrieben auch Cawley *et al.* und schlugen die Bezeichnungen  $\alpha$  und  $\beta$  für die N- bzw. C- terminale Untereinheit vor (Cawley *et al.*, 2003). N- terminale Sequenzierungen dieser Untereinheiten gaben Aufschluss über den genauen Trennungspunkt der  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten (Cawley *et al.*, 2003). Wie Abbildung 33 verdeutlicht, werden die beiden Untereinheiten von Sap9 wahrscheinlich durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten, wodurch auch die beiden Aspartatreste des katalytischen Zentrums in räumlicher Nähe verbleiben und somit die Funktionalität der Sap9 Protease gewährleistet ist. Ein ähnliches strukturelles Muster zeigt die Aspartatprotease Yapsin1 bei der die  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten durch Disulfidbrücken verknüpft sind (Cawley *et al.*, 1998). Neben der bereits erwähnten GPI Verankerung wird auch hier die hohe Ähnlichkeit des Yapsin1 aus *S. cerevisiae* mit der Sap9 Protease aus *C. albicans* deutlich. Andere Aspartatproteasen, wie zum Beispiel Cathepsin D aus Säugetieren, die Protease A aus *Aspergillus niger* oder pflanzliche Aspartatproteasen werden ebenfalls in zwei Untereinheiten gespalten (Runeberg-Roos *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1991; Yonezawa *et al.*, 1988), unterscheiden sich jedoch von Yps1 und Sap9 durch

(1) unterschiedliche Prozessierungsstellen innerhalb der Moleküle und (2) dadurch, dass die Untereinheiten durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten werden (Runeberg-Roos *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1991; Yonezawa *et al.*, 1988).

Die heterolog exprimierte Protease Sap9 ist in der Lage das synthetisierte Peptide KIHNKLFGE zwischen den Aminosäuren Lysin / Leucin (K / L) zu prozessieren. Bei diesem synthetischen Peptid handelt es sich um einen Sequenzbereich der mit der Sap9 Proteinsequenz identisch ist. Dabei entspricht die Prozessierungsstelle des Peptides exakt der Trennungsstelle der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  (Abb. 33). Somit ist eine Autokatalyse des Sap9 Proteins sehr wahrscheinlich. Für Yps1 wurde eine solche Autokatalyse nachgewiesen, da eine Mutation innerhalb des aktiven Zentrums von Yps1 zum Ausbleiben der Prozessierung in zwei Untereinheiten führte (Olsen and Loh, 2000).



### Abbildung 33. Struktureller Aufbau der Protease Sap9

Ähnlich dem Sap10 Protein besitzt Sap9 N-terminale Prozessierungssequenzen der Signalpeptidase (SP) des endoplasmatischen Retikulums und der, im späten Golgi Apparat lokalisierten Protease Kex2 (KR), sowie die C-terminale Konsensussequenz für eine GPI Verankerung, welche sich aus einer Serin / Threonin – reichen Region (S/T), der Omegaposition ( $\omega$ ) und einem hydrophoben Bereich (H) zusammensetzt. Neben den zwei Aspartatresten (D) des katalytischen Zentrums liegen vier Cysteinreste (C) vor, die zur Ausbildung von Disulfidbrücken genutzt werden. Die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , welche wahrscheinlich durch Autoprozessierung der Sequenz NK<sub>153</sub> / L<sub>154</sub>F entstehen, werden durch eine der beiden Disulfidbrücken zusammengehalten.

#### **IV.2.4. Anmerkungen zur Erzeugung von Mutanten mit der Ura – Blaster Methode**

Im Unterschied zum haploiden Modelorganismus *S. cerevisiae* ist für die Deletion eines Gens in dem diploiden Pilz *C. albicans* das Ausschalten beider Allele nötig. Die bis heute häufigste und auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode zur Genzerstörung bei *C. albicans* ist die Ura – Blaster Methode (Fonzi and Irwin, 1993). Entstehende heterozygote und homozygote Mutanten können Ura auxotroph oder Ura prototroph sein, wobei ein neutraler Effekt des Ura Status für die Biologie und Virulenz des Pilzes angenommen wurde. Bain *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Adhäsion einiger Mutantenstämme in Abhängigkeit des Ura Status variiert (Bain *et al.*, 2001). Weiterhin kann die ektopische Expression des *URA3* Gens den Virulenzphänotyp beeinflussen (Brand *et al.*, 2004). Dieser Lokalisationseffekt ist mit einer unterschiedlichen Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie erklärbar. Bei einer gezielten Reintegration des *URA3* Gens in den *RPS10* Locus kann jedoch zumindest dieses Problem überwunden werden, da der *RPS10* Locus offensichtlich eine ständige Zugänglichkeit der für die Transkription nötigen Proteine erlaubt (Brand *et al.*, 2004). Neuere, meist auf PCR basierende Techniken, welche zum Teil deutlich schneller zur Erzeugung einer Mutante führen können, stützen sich ebenfalls auf Auxotrophiemarker (Gola *et al.*, 2003; Noble and Johnson, 2005). Da einige Konsequenzen der jeweiligen Markerwahl möglicherweise noch unbekannt sind, können auch bei diesen Methoden markerabhängige Phänotypen auftreten. Daher ist die Wahl der Kontrollstämme mit gleichem genetischen Hintergrund und Markerstatus, wie ihn die zu untersuchende Mutante besitzt, entscheidend, um Phänotypen aufgrund des „Markereffekts“ auszuschließen. Aus diesem Grund wurden Mutanten in dieser Arbeit mit der Ura – Blaster Methode hergestellt, in den Ura – auxotrophen Zustand überführt und mit dem pClp10 Plasmid (enthält den *URA3* Marker und integriert am *RPS10* Locus) transformiert. Ähnlich wurde mit dem CAI4 Kontrollstamm verfahren. Somit wurden nur Stämme verglichen, bei denen das *URA3* Marker Gen am gleichen Locus integriert war.

#### **IV.2.5. Die Proteasen Sap9 und Sap10 sind für die Integrität der Zelloberfläche von maßgeblicher Bedeutung**

Die Untersuchung der erzeugten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Einzel- und Doppelmutanten erbrachte erste Hinweise auf die Funktion der Proteasen Sap9 und Sap10. Da sich die Mutanten auf Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen, Salzen, oder hypheninduzierenden Substanzen, bei unterschiedlichen pH Werten und Temperaturen oder unter anaeroben Bedingungen nicht vom Wildtyp unterschieden, kann gefolgert werden, dass beide Proteasen unter diesen Anzuchtbedingungen nicht essentiell sind. Eine Beteiligung an diesen Prozessen kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da der funktionelle Ausfall der Proteasen Sap9 und Sap10 unter bestimmten Bedingungen durch andere Proteine vollständig kompensiert werden könnte.

Interessant ist die Beobachtung, dass die Mutanten auf dem hypheninduzierenden Medium Serum keinen Phänotyp zeigten, da die Expression der Gene *SAP9* und *SAP10* im Wildtyp in einer Serum-Flüssigkultur im Vergleich zum Standardmedium verändert war. Das *SAP9* Gen zeigte eine signifikante Expressionssteigerung, was auch bei zwei von drei biologischen Kontrollansätzen für das *SAP10* Gen zutraf. In einem dritten Kontrollansatz wurde eine deutliche Expressionsverringering nachgewiesen, was auf eine sensible Regulation des *SAP10* Gens unter bestimmten Bedingungen deutet. Sap9 und Sap10 besitzen möglicherweise eine Funktion während des Wachstums in Serum, wobei der nicht beobachtete Phänotyp der Mutanten auf eventuelle Unterschiede der Fest- bzw. Flüssigmediumanzucht oder auf Kompensierung durch andere Proteine zurückgeführt werden könnte.

Bemerkenswerter Weise zeigten die Mutanten auch auf einem BSA-enthaltenden Medium keine Wachstumsunterschiede gegenüber dem Wildtyp. Für die Nutzung des BSA als alleinige Stickstoffquelle ist hauptsächlich die extrazelluläre Aktivität der Sap2 Protease notwendig (Hube *et al.*, 1997). Somit scheint die Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* unter diesen Bedingungen keinen bedeutenden Einfluss auf die Expression,

Prozessierung und Funktionalität der Sap2 Protease auszuüben. Wiederum ist es möglich, dass mögliche Funktionen der Proteasen Sap9 und Sap10 von anderen Proteasen mit übernommen werden können, zum Beispiel durch Kex2, dessen Beteiligung an der korrekten Prozessierung des Sap2 Proproteins bereits eindeutig nachgewiesen werden konnte (Newport and Agabian, 1997). Eine Autokatalyse von Sap2 ist ebenfalls vorstellbar (Koelsch *et al.*, 2000).

Medienzusätze, welche eine deutliche Wachstumsverringering bei allen Einzel- und Doppelmutanten hervorriefen haben die gemeinsame Eigenschaft, dass sie die Integrität der Zelloberfläche direkt oder indirekt anzugreifen. Dabei erbrachte der Vergleich der Einzelmutanten mit der Doppelmutante mit einer Ausnahme, Hygromycin B – enthaltende Medien, keinen „additiven“ Effekt der Phänotypen bei der Doppelmutante. Das Verhalten der Mutanten auf Hygromycin B – enthaltenden Medien ist aus einem weiteren Grunde interessant: aufgrund der beobachteten Wachstumsverringering infolge der Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* wäre eine Expressionssteigerung dieser Gene im Wildtyp als Antwort auf das Vorhandensein von Hygromycin B vorstellbar. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Anwesenheit von Hygromycin B hatte auf die Expression des *SAP10* Gens keine signifikanten Auswirkungen und führte im Falle des *SAP9* Gens sogar zu einer signifikanten Expressionsverringering. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Itraconazol, welches in allen Mutanten eine Wachstumsverringering bewirkte, im Wildtyp zu einer signifikanten Expressionssteigerung des *SAP9* Gens. Demnach sind Sap9 und Sap10 aufgrund der Mutantenphänotypen für die Integrität der Zelloberfläche von Bedeutung. Es besteht jedoch nicht zwingend ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen den Proteasen Sap9, Sap10 und dem phänotyp hervorriefenden Medium. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine veränderte Durchlässigkeit der Zellwand für extrazelluläre Moleküle infolge fehlender Aktivitäten von Sap9 oder Sap10 (siehe unten).

Eine weitere Bestätigung der Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 für die Integrität der Zelloberfläche lieferte die Überexpression der jeweiligen

Protease im Wildtyp. Getestete Medien, welche in den Proteasemutanten eine Wachstumsminderung hervorriefen, führten in den Überexpressionstämmen zu einer deutlichen Wachstumssteigerung gegenüber dem Wildtypstamm.

Einen Einfluss auf die Expression einiger *SAP* Gene in Abhängigkeit des gewählten Antimykotikums konnten Copping *et al.* nachweisen (Copping *et al.*, 2005). Sie zeigten einen Anstieg extrazellulärer Proteaseaktivität, sowie eine Expressionssteigerung der Gene *SAP2* und *SAP9* in Gegenwart von Fluconazol. Im Gegensatz zu einer  $\Delta sap2$  Mutante hatte die Deletion des *SAP9* Gens keine Auswirkungen auf die extrazelluläre proteolytische Aktivität, sodass die gemessene Proteaseaktivität wahrscheinlich mit der *SAP2* Genexpression im Zusammenhang stand (Copping *et al.*, 2005). Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die Bestimmung der Proteaseaktivität durch Copping *et al.* auf Grundlage der Hydrolyse des BSA Substrates beruhte (Copping *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass BSA nicht zu den Substraten der Protease Sap9 gehört. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Anzucht in einer BSA enthaltenden Kultur zu keiner signifikanten Änderung der Expression des *SAP9* Gens führte. Die Arbeiten von Copping *et al.* bestätigen aber die hier gemachten Beobachtungen, dass Sap9 und Sap10 nicht maßgeblich an der Aktivierung von Sap2 beteiligt sind.

Nur wenige Medienzusätze bewirkten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Mutanten, wie zum Beispiel der Zusatz von Nikkomycin Z, welches bei der  $\Delta sap9$  Mutante, nicht aber bei der  $\Delta sap10$  Mutante einen Phänotyp hervorrief. Erwähnenswert ist auch das Verhalten auf Medien mit dem Zusatz Caspofungin. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten, phänotyphervorrufenden Medien führte die Zugabe von Caspofungin (einem Inhibitor der  $\beta$ -1,3-D – Glukansynthase) zu einem deutlichen Wachstumsvorteil der  $\Delta sap10$  Mutante, wohingegen die  $\Delta sap9$  Mutante ein abgeschwächtes Wachstum aufwies. Möglicherweise kommt es infolge der Deletion des *SAP10* Gens zu Strukturänderungen der Oberfläche, die ein Eindringen des Caspofungins und somit die Hemmung der

$\beta$ -1,3-D – Glukansynthase erschweren. Eine andere Interpretationsmöglichkeit liegt in einer unterschiedlichen strukturellen Abhängigkeit der Zellwände der beiden Mutanten von  $\beta$ -1,3-D – Glukan durch andere stabilisierende Komponenten wie Chitin oder  $\beta$ -1,6-D – Glukan. Interessant ist in diesem Zusammenhang das Verhalten der Doppelmutante, welche in ihrem Wachstum der  $\Delta sap10$  Mutante entspricht. Somit ist die Deletion von *SAP10* unter diesen Bedingungen dominant gegenüber der Deletion des *SAP9* Gens.

Zusammenfassend beruht die Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 für die Integrität der Zelloberfläche auf ähnlichen und möglicherweise zum Teil überlappenden Funktionen dieser beiden Proteasen. Darüber hinaus bestehen klare, auch aufgrund der verschiedenen Lokalisationen und Spezifitäten begründbare, funktionelle Unterschiede. Dies wird ebenfalls durch die Tatsache, dass eine Disruption von *SAP9* oder *SAP10* alleine zum Teil drastische Phänotypen hervorruft, bewiesen.

Yapsine aus *S. cerevisiae* spielen ebenfalls eine Rolle für die Integrität der Zelloberfläche (Krysan *et al.*, 2005). Einzelmutanten der Yapsin Gene zeigen jedoch nur selten signifikante Phänotypen, was auf überlappende Funktionen dieser Proteasen zurückgeführt wird (Gagnon-Arsenault *et al.*, 2005).

Transkriptomuntersuchungen von *S. cerevisiae* deuten auf ein Cluster coregulierter Gene, welche bei Anwesenheit von Zelloberflächen – angreifender Substanzen hochreguliert werden (Garcia *et al.*, 2004). Die Expression dieses Genclusters, zu dem auch *YPS1* und *YPS3* gehören, wird möglicherweise hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor des Zellwand – Integrität – Signalweges Rlm1 reguliert (Garcia *et al.*, 2004). In der Promotorregion des *SAP9* Gens befindet sich eine putative Rlm1 Bindestelle, wodurch eine ähnliche Regulation vorstellbar ist. Mikroarrayanalysen der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  innerhalb der mittleren logarithmischen Phase deuten aufgrund der ausbleibenden Expressionssteigerung jedoch auf keinen direkten Zusammenhang der Deletion der jeweiligen Protease und der Genexpression des Zellwand – Integrität – Signalweges. Es besteht aber die Möglichkeit, dass diese Regulation auf Ebene der Proteinaktivierung

erfolgt. Die Änderung des Expressionsniveaus kann unter Umständen auch nur in einem kurzen Zeitfenster nachweisbar sein.

Gene, von denen eine erhöhte Expression bei Mikroarrayanalysen in beiden Proteasemutanten nachgewiesen wurde, kodieren überwiegend für Proteine mit unbekannter Funktion. Die Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzen dieser Gene konnte jedoch aufzeigen, dass es sich dabei häufig um putative Membranproteine handelt, deren orthologe Proteine in *S. cerevisiae* an der Organisation des Aktin bzw. Zytoskeletts oder dem Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat beteiligt sind und somit die Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 für die Integrität der Zelloberfläche untermauern.

#### **IV.2.6. Die Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* bewirkt eine Änderung der Zellwandzusammensetzung**

Eine Folge der Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10* ist die Beeinträchtigung der Integrität der Zelloberfläche. Substanzen, welche die Zelloberfläche angreifen können kompensatorische, strukturelle Änderungen innerhalb der Zellwand bewirken. Eine mögliche Antwort ist die Erhöhung des Chitingehalts innerhalb der Zellwand (De Groot *et al.*, 2005). Dies ist zum Beispiel bei einer  $\Delta kre5$  Mutante der Fall (Herrero *et al.*, 2004). Die Deletion des *KRE5* Gens, dessen, im endoplasmatischen Retikulum aktiven Genprodukt als Glykosyltransferase an der Glukansynthese beteiligt ist, führt neben der erwarteten Verringerung des Glukans zu einer kompensatorischen Steigerung des Chitingehalts (Herrero *et al.*, 2004). Auch die Deletion des *GPI7* Gens hat eine Erhöhung des Chitingehalts der Zellwand zur Folge (Richard *et al.*, 2002). Gpi7 ist ein, in der Plasmamembran lokalisiertes Protein und an der Synthese der GPI Core Struktur beteiligt. Sowohl die Deletion des *KRE5* als auch des *GPI7* Gens beeinflusst die Integrität der Zelloberfläche (Herrero *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2002). Der erhöhte Chitingehalt der  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Mutanten kann damit erklärt werden,



dass durch die fehlende Prozessierung bestimmter Proteine wichtige strukturelle Elemente der Zelloberfläche fehlerhaft sind und in zu geringem Umfang produziert werden. Als Folge dieser Mängel wird eine kompensatorische Hochregulation anderer struktureller Elemente eingeleitet. Diese Regulation scheint jedoch anders zu verlaufen als bei *S. cerevisiae* (siehe oben).

#### **IV.2.7. Die fehlende Aktivität der Proteasen Sap9 und Sap10 führt während der Sprossung zu einer Fehlfunktion der Trennung von Mutter – und Tochterzelle**

Die strukturelle Organisation der Zellwand spielt auch bei der Zelltrennung eine entscheidende Rolle. Stämme, denen die Chitinsynthase Chs1 fehlt, zeigten eine Dysfunktion bei der Trennung von Mutter – und Tochterzelle ähnlich wie bei den  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Einzel – und Doppelmutanten (Munro *et al.*, 2001). Die Deletion des Transkriptionsfaktors Ace2, welcher homolog zu dem Transkriptionsfaktorpaar Ace2 und Swi5 aus *S. cerevisiae* und ein Hauptregulator des Zellwandmetabolismus ist, bewirkte ebenfalls die Bildung von Zellaggregaten als Folge eines Trennungsdefekts (Kelly *et al.*, 2004). Der erhöhte Chitingehalt und die auf TEM Aufnahmen erkennbare und im Vergleich zum Wildtyp stärkere Verdickung der Zellwand, vor allem im Bereich der Sprossungszone (Bereich zwischen Mutter – und Tochterzelle) sind wahrscheinlich für das Auftreten von Zellaggregaten bei den  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Mutanten mitverantwortlich. Eine solche strukturelle Veränderung der Zellwand kann zum Beispiel den Transport benötigter Enzyme oder Materials für die Zelltrennung erschweren. Es ist weiterhin möglich, dass diese Enzyme oder das Material aufgrund des Fehlens der Sap9 und Sap10 Aktivität nicht oder unkorrekt prozessiert werden. Darüber hinaus ist es bei Zellteilungen notwendig, dass zum Beispiel durch hydrolytische Aktivitäten Bindungen aufgelockert oder entfernt werden, damit sich Mutter – und Tochterzelle trennen können. Die Proteasen Sap9 und Sap10 könnten

an einer solchen Aktivität direkt oder indirekt beteiligt sein. Die Auswahl der Sprossungsstelle während der bipolaren Sprossung scheint aber davon unabhängig zu sein.

#### **IV.2.8. Mutantenstämme denen die Gene *SAP9* und *Sap10* fehlen, weisen eine abgeschwächte Virulenz und ein geändertes Adhäsionsverhalten auf**

Die Proteasen Sap9 und Sap10 sind auch für die volle Ausprägung der Virulenz verantwortlich. In einem Tiermodell für systemische Infektionen bewirkte die Deletion des *SAP9* bzw. des *SAP10* Gens eine moderate Abschwächung der Virulenz. Unerwartet war in diesem Zusammenhang das Verhalten der  $\Delta sap9$ [*SAP9*] Retransformante. Sie wies im Vergleich zum Wildtyp, aber auch im Vergleich zur  $\Delta sap9$  Mutante eine reduzierte Virulenz auf. Dieses Phänomen ist nicht unbekannt und auch in anderen Versuchsreihen aufgetreten (F. Odds, persönliche Mitteilung). Die Gründe sind jedoch noch unklar und wegen der schwierigen Publikationsmöglichkeit solcher Daten, sind auch kaum weitere Angaben in der Literatur zu finden. Dies zeigt die möglichen Grenzen dieser Modelle oder Vorgehensweisen auf und verdeutlicht, dass die Ausprägung der Virulenz durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren beeinflusst wird. Da die Retransformation des nativen *SAP9* Gens in allen anderen Versuchen den Phänotyp der  $\Delta sap9$  Mutante rückgängig gemacht hat, wurden die „Molekularen Koch'schen Postulate“ (Falkow, 1988) zumindest für die beobachteten Phänotypen der  $\Delta sap9$  Mutante erfüllt und konnten auch tatsächlich auf die Deletion des *SAP9* Gens zurückgeführt werden.

Andere Mitglieder der Sap Familie, wie zum Beispiel Sap4 bis Sap6, sind von signifikanter Bedeutung für den Verlauf systemischer Infektionen (Sanglard *et al.*, 1997a). Diese drei Efg1 – regulierten Proteasen sind bei systemischen Infektionen an der Invasion der Leber und des Pankreas beteiligt (Felk *et al.*,

2002). Im Vergleich dazu ist die Bedeutung der Proteasen Sap9 und Sap10 bei systemischen Infektionen eher untergeordnet.

Ein anderes Bild ergab sich bei den Untersuchungen eines Modells für Oberflächeninfektionen. Hierbei bewirkte die Deletion der Gene *SAP9* oder *SAP10* eine signifikant verminderte Schädigung der Epithelzellen des RHE Modells. Auch andere Sap Familienmitglieder scheinen in diesem Infektionsmodell eine Rolle zu spielen. Obwohl fast alle *SAP* Gene in einem Modell vaginaler Epithelzellen exprimiert werden (Schaller *et al.*, 2003), wurde den Proteasen Sap1 bis Sap3 bei Oberflächeninfektionen die vorrangige Rolle zugeschrieben (Schaller *et al.*, 1999).

Die Ursachen der verringerten Epithelzellschädigung durch die Mutanten  $\Delta sap9$ ,  $\Delta sap10$  oder auch  $\Delta sap9/\Delta sap10$  könnten auf veränderte Eigenschaften während des Adhäsions- oder Invasionsprozesses zurückgeführt werden. Zumindest für die Protease Sap10 ist es wahrscheinlich, dass sie an der Adhäsion beteiligt ist, da deren Deletion zu einer signifikant geringeren Adhäsion an oralen Epithelzellen führte. Im Gegensatz zur  $\Delta sap10$  Mutante war die  $\Delta sap9$  Mutante durch ein signifikant erhöhtes Adhäsionsverhalten gekennzeichnet. Sap9 könnte also als Anti-Adhäsion bezeichnet werden. Auch für andere, am Aufbau der Zelloberfläche beteiligte Proteine konnte gezeigt werden, dass die Gendeletion sowohl eine Adhäsionsverringerng als auch eine Adhäsionssteigerung zur Folge haben kann. Die Deletion des Oberflächenproteins Als3 führt zu einer Adhäsionsverringerng an orale Epithelzellen (Zhao *et al.*, 2004). Ähnliches ist für die Adhäsion an Plastikoberflächen bei einer Deletion des Transkriptionsfaktors Ace2 zu beobachten, dem eine Funktion bei der Regulation des Zellwandmetabolismus zugeschrieben wird (Kelly *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu führt der Verlust des GPI verankerten Zellwandproteins Pga24 zu einer erhöhten Adhärenz an Plastikoberflächen (Granger *et al.*, 2005), ähnlich dem Phänotyp der  $\Delta sap9$  Mutante bei der Adhäsion an oralen Epithelzellen.

In diesem Zusammenhang sind die Beobachtungen zur Adhäsion der Doppelmutante  $\Delta sap9/\Delta sap10$  an die oralen Epithelzellen erwähnenswert.

Dem Phänotyp der  $\Delta sap10$  Einzelmutante entsprechend, ist die Doppelmutante in ihrer Adhärenz signifikant abgeschwächt. Dies spricht wiederum für eine Dominanz der Deletion des *SAP10* Gens gegenüber der des *SAP9* Gens, was bereits beim Wachstum der entsprechenden Mutanten auf einem Medium mit Caspofungin beobachtet wurde. Möglicherweise stehen die beiden Proteasen insofern in einem direkten Verhältnis zueinander, als sie Proteine prozessieren, die direkt miteinander interagieren, deren Aktivität voneinander abhängt oder deren Produkte in direkter Wechselwirkung stehen. So ist es zum Beispiel möglich, dass Sap9 ein Adhäsion maskiert, während Sap10 es demaskiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Sap9 und Sap10 kooperieren, indem von Sap10 prozessierte Proteine an die Epithelzellen adhären, und Sap9 die Adhäsionseigenschaften dieser Proteine durch weitere Prozessierungen ändert und die Adhäsion dadurch verringert oder ganz beseitigt wird.

Aufgrund der erhöhten Adhäsion der  $\Delta sap9$  Mutante besteht aber auch die Möglichkeit, dass Sap9 für eine Prozessierung verantwortlich ist, welche eine starke Adhäsion lockert und so die Invasion ermöglichen könnte. Eine solche Art der Prozessierung ist zum Beispiel bei den Malariaparasiten *Plasmodium* spp. und dem Toxoplasmose hervorrufenden Parasit *Toxoplasma gondii* bekannt (Carruthers and Blackman, 2005). Dabei werden Oberflächenproteine von der Parasitenoberfläche abgetrennt oder Verbindungen zwischen Ligand und Wirtrezeptor unterbrochen (Carruthers and Blackman, 2005). Bisher sind zwei verschiedene Arten dieser Prozessierung bekannt, welche sich zeitlich und räumlich voneinander unterscheiden, da sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschiedenen Stellen der Parasitenoberfläche (auch innerhalb der Plasmamembran) auftreten (Carruthers and Blackman, 2005). Gegen einen solchen Mechanismus bei *C. albicans* spräche allerdings die Tatsache, dass bei der Hyphenbildung ein Wachstum an der Hyphenspitze erfolgt und somit eine direkte und aktive Penetration in Wirtsgewebe möglich ist, ohne dass sich der Rest der Zelle bewegen muss, während sich die oben erwähnten

Parasiten bei der Invasion gleitend bewegen und so von festen Bindungen lösen müssen.

Andere Mitglieder der Sap Familie sind möglicherweise ebenfalls an der Adhäsion beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass generell Stämme mit starker Proteaseproduktion auch eine starke Adhäsion zu oralen Epithelzellen aufweisen (Abu-Elteen *et al.*, 2001). Die Zugabe des Proteaseinhibitors Pepstatin A bewirkte eine Abschwächung der Adhäsion an die humane Schleimhaut (Borg and Rüchel, 1988), Keratinozyten (Ollert *et al.*, 1993) und Korneozyten (Ray and Payne, 1988). Mit Hilfe von HIV Proteaseinhibitoren konnte die Beteiligung der Proteasen Sap1 bis Sap3 am Adhäsionsprozess nachgewiesen werden (Borg-von Zepelin *et al.*, 1999). Für eine Beteiligung der Proteasen Sap1 bis Sap3 an Adhäsionsprozessen spricht auch, dass die entsprechenden Mutanten in ihrer Adhäsion moderat abgeschwächt waren (Watts *et al.*, 1998). Allerdings führte bisher keine Deletion eines *SAP* Gens zu einer so starken Abschwächung der Adhäsion, wie sie in dieser Arbeit für die *sap9/Δsap10* Doppelmutante oder die *Δsap10* Einzelmutante gezeigt wurde. Deshalb ist es möglich, dass die früheren Beobachtungen zur Abschwächung der Adhäsion durch Pepstatin A auf die Inhibition von Sap10 zurückzuführen ist.

Es ist aber auch möglich, dass verschiedene Mitglieder der Sap Familie an Adhäsionsprozessen beteiligt sind, wobei sie unterschiedliche Aufgaben erfüllen könnten, zum Beispiel eine Modifikation der Zelloberflächen auf der Wirtsseite bei den sekretorischen Proteasen und eine Modifikation auf der Pilzseite bei den GPI verankerten Proteasen.

#### **IV.2.9. Mögliche Substrate der Proteasen Sap9 und Sap10**

Großes Interesse gilt selbstverständlich den möglichen Substraten der beiden Proteasen Sap9 und Sap10. Aufgrund der Lokalisation an der Zelloberfläche ist die Prozessierung pilzeigener Proteine aber auch externe Wirtproteine vorstellbar. Letztere scheinen jedoch nicht von Sap9 oder

Sap10 prozessiert zu werden. Humane Proteine, welche als Substrate anderer Saps, vor allem des Sap2 bekannt sind (Hube, 1996) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet wurden, können nicht als Substrate der Proteasen Sap9 und Sap10 bezeichnet werden. Interessant waren hingegen die Ergebnisse des ebenfalls getesteten putativen Substrates BSA. Ein proteolytischer Abbau des BSA durch Sap9 und Sap10 war nicht zu beobachten. Betrachtet man jedoch die Expression der Gene *SAP9* und *SAP10* in Gegenwart von BSA im Vergleich zu einem Standard Medium, so ließ sich für das *SAP10* Gen in zwei von drei biologischen Wiederholungen eine deutliche Expressionssteigerung feststellen. Sap10 könnte demzufolge indirekt, durch Prozessierung anderer Proteasen am Abbau des BSA beteiligt sein. Da jedoch die  $\Delta sap10$  Mutante ebenso wie die  $\Delta sap9$  Mutante und  $\Delta sap9/\Delta sap10$  Doppelmutante ein, dem Wildtyp entsprechendes Wachstumsverhalten auf BSA Medium aufweisen, kann diese putative Funktion der Sap10 Protease von anderen Enzymen vollständig kompensiert werden.

Aufgrund der Phänotypen der  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  Mutanten muss geschlussfolgert werden, dass die Proteasen Sap9 und Sap10 pilzeigene Proteine prozessieren. In dieser Arbeit wurden verschiedene Hinweise auf mögliche Substrate der beiden Proteasen erhalten. Demnach sind, durch Sap9 oder Sap10 prozessierte Proteine am Aufbau bzw. der Integrität der Zelloberfläche beteiligt und spielen eine bedeutende Rolle während der Zellteilung, des Adhäsionsprozesses und der Virulenzausprägung. Aufgrund der Lokalisation von Sap9 und Sap10 müssen die Zielproteine ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert sein oder als sekretorische Proteine an diesen Proteasen vorbeigeführt werden.

GPI verankerte Proteine gehören aufgrund ihrer Lokalisation an der Zelloberfläche zu der Gruppe putativer Substrate der Proteasen Sap9 und Sap10. *In silico* Analysen des *C. albicans* Genoms konnten 104 mutmaßliche GPI Proteine bestimmen (De Groot *et al.*, 2003). Einige dieser Proteine wurden durch biochemische Untersuchungen des Proteoms identifiziert (de Groot *et al.*, 2004; Sundstrom, 2002). Dazu gehören Proteine, deren

Funktion zum Teil wegen ihrer Homologie zu Proteinen aus *S. cerevisiae* abgeleitet wurde, wie zum Beispiel die pH regulierte Glykosyltransferase Phr1, das am Zellwandaufbau und möglicherweise an der Knospung beteiligte Protein Ecm33 sowie die putative Glykosidase der Zellwand Crh1. Weiterhin handelt es sich um Proteine ohne signifikanten, homologen Partner, wie zum Beispiel die „Agglutinin like“ Proteine Als1 und Als4, das durch den Transkriptionsfaktor Tup1 regulierte Rbt5 und das in Zellwänden der Hyphen vorkommende Hwp1. Interessanter Weise führen Mutationen einiger Oberflächenproteine zu ähnlichen Phänotypen wie die Deletion der Gene *SAP9* und *SAP10*. Beispielsweise wies eine  $\Delta ecm33$  Mutante Wachstumsdefizite in Anwesenheit von Congo Red oder Hygromycin B auf (Pardo *et al.*, 2004).

Andere Proteine, welche für die Integrität der Zelloberfläche von Bedeutung sind und deren korrespondierende Mutanten dem Verhalten der Mutanten  $\Delta sap9$  oder  $\Delta sap10$  ähneln, wurden bereits im Zusammenhang des erhöhten Chitingehalts (Kre5, Gpi7, siehe IV.2.6), der Dysfunktion bei der Zellteilung (Chs1, Ace2, siehe IV.2.7) oder der veränderten Adhäsionseigenschaften (Als3, Pga24, siehe IV.2.8) beschrieben. Infolge eines solchen phänotypischen Verhaltens ist eine Regulation der entsprechenden Proteine durch die Proteasen Sap9 oder Sap10 vorstellbar.

#### **IV.2.9.1. Das Prozessierungsmuster von Sap9 und Sap10 ähnelt dem der Protease Kex2 und der Yapsine aus *Saccharomyces cerevisiae***

Auf der Prozessierung von synthetisierten Peptiden beruhende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Proteasen Sap9 und Sap10 ähnliche und zum Teil auch identische Erkennungssequenzen prozessieren. Es existieren jedoch auch spezifische Prozessierungsstellen, welche ausschließlich von einer der beiden Proteasen erkannt werden. Diese Analysen unterstützen die Schlussfolgerungen, die sich aus den

beobachteten Phänotypen der entsprechenden Mutantenstämme ergaben. Die Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$  zeigen spezifische, aber zu einem großen Teil auch ähnliche Phänotypen. Das Beispiel des Adhäsionsverhaltens zeigt ebenfalls die voneinander abweichende Spezifität der beiden Proteasen. Ähnliches trifft auf die Überexpression des *SAP9* Gens in der  $\Delta sap10$  Mutante bzw. auf die Überexpression des *SAP10* Gens in der  $\Delta sap9$  Mutante zu. Eine vollständige Komplementierung der jeweiligen Phänotypen war nicht zu beobachten, sodass eine überlappende Funktion der beiden Proteasen nur bedingt vorzuliegen scheint. Bemerkenswert ist wiederum das Verhalten des *SAP10* Gens. Bereits in anderen Untersuchungen, wie dem Adhäsionsassay oder dem Wachstumstest auf Caspofungin – enthaltenden Medien, war die Dominanz der Deletion des *SAP10* Gens gegenüber der Deletion des *SAP9* Gens zu beobachten. Unter den getesteten Bedingungen war der Einfluss der Sap10 Aktivität stärker ausgeprägt als die Sap9 Aktivität. Dies spiegelte sich in einer stärkeren Phänotypkomplementierung durch die Überexpression des *SAP10* Gens in der  $\Delta sap9$  Mutante, als es für die Überexpression des *SAP9* Gens in der  $\Delta sap10$  Mutante zu beobachten war wieder. Auch wenn keine großen, überlappenden Funktionsbereiche der beiden Proteasen vorhanden zu sein scheinen, deutet eine zweifache Expressionssteigerung des *SAP9* Gens in der  $\Delta sap10$  Mutante bzw. des *SAP10* Gens in der  $\Delta sap9$  Mutante auf eine zum Teil funktionelle Überlappung.

Die Prozessierungsmuster der Proteasen Sap9 und Sap10 ähneln den bekannten Erkennungssequenzen der, im trans – Golginetzwerk lokalisierten Protease Kex2 und den GPI verankerten Yapsinen aus *S. cerevisiae*. Für die Yapsine Yps1 und Yps2 (zuvor Mkc7) konnte gezeigt werden, dass sie den Defekt der pro –  $\alpha$  Faktor Prozessierung einer  $\Delta kex2$  Mutante supprimieren können (Egel-Mitani *et al.*, 1990; Komano and Fuller, 1995). Spezifische *in vivo* Substrate und die physiologische Rolle der Yapsine sind jedoch weitgehend unbekannt. Neuere Untersuchungen beschreiben Yps1 als „Sheddase“ der GPI verankerten  $\beta$ -1,3 Glukanosyltransferase Gas1 und beschreiben in diesem Zusammenhang die Bedeutung des Yps1 für die



Integrität der Zelloberfläche (Gagnon-Arsenault *et al.*, 2005). Krysan *et al.* postulierten ebenfalls eine Rolle des Yps1 für die korrekte Zusammensetzung der Zelloberfläche und wiesen eine Expressionssteigerung des *YPS1* Gens infolge von Zellwandstress nach (Krysan *et al.*, 2005). Die Protease Sap9 aus *C. albicans* ist in der Lage Phänotypen einer  $\Delta yps1$  Mutante zu komplementieren (Krysan *et al.*, 2005), wodurch die, zumindest zum Teil vorhandene funktionelle Ähnlichkeit dieser Proteasen veranschaulicht wird.

Wie bei den Proteasen Kex2, Yps1 und Yps2 aus *S. cerevisiae* gezeigt wurde und wie oben bereits diskutiert, sind zumindest teilweise überlappende Funktionen der Proteasen Kex2, Sap9 und Sap10 in *C. albicans* wahrscheinlich. Eine funktionelle Überlappung von Kex2 auf der einen und Sap9 oder Sap10 auf der anderen Seite wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: (1) die Gene *SAP9* bzw. *SAP10* sind in der  $\Delta kex2$  Mutante von *C. albicans* 1,5 – bzw. 1,7 fach stärker exprimiert; (2) durch Überexpression der Gene *SAP9* bzw. *SAP10* in der  $\Delta kex2$  Mutante erfolgte eine teilweise Komplementierung der getesteten  $\Delta kex2$  Phänotypen. Die unterschiedliche Lokalisation dieser drei Proteasen deutet jedoch auf verschiedene Substrate. Aufgrund der ähnlichen Prozessierungsstellen ergibt sich die Frage, wie es möglich ist, dass putative Substrate der Kex2 Protease zur Zelloberfläche gelangen, ohne bereits von Kex2 prozessiert zu werden. Es besteht die Möglichkeit, dass entsprechende Sequenzen innerhalb des trans – Golginetzwerks unzugänglich sind und erst durch entsprechende Konformationsänderungen an der Zelloberfläche zugänglich werden. Weiterhin zeigten neue Untersuchungen, dass Oberflächenproteine auf verschiedene Weise zur Zelloberfläche transportiert werden (Frieman and Cormack, 2003; Mayor and Riezman, 2004; Muniz *et al.*, 2001). Aufgrund der verschiedenen Transportwege und der Verpackung in bestimmte Vesikel wäre es also möglich, den Aktionsbereich der Kex2 Protease nicht zu passieren, und trotzdem zur Zelloberfläche zu gelangen.

Ein Großteil der, im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Peptide, ist mit den Proenzymsequenzen einiger Mitglieder der Sap Familie identisch.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die Prozessierung der sekretorischen Aspartatproteasen durch die Kex2 Protease nur für Sap2 nachgewiesen werden (Newport and Agabian, 1997). Es besteht daher die Möglichkeit, dass einige Mitglieder der Sap Familie durch Sap9 oder Sap10 prozessiert werden. Für das GPI verankerte Zellwandprotein Pga24 konnte bereits nachgewiesen werden, dass dessen Prozessierung vermutlich Kex2 unabhängig erfolgt (Granger *et al.*, 2005). Die beobachtete Prozessierung wurde bei Zugabe des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A vermindert, wohingegen anderen Proteaseinhibitoren keinen Einfluss auf die Prozessierung besaßen (Granger *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der Proteasen Sap9 und Sap10 in diesem Prozess. Auch bereits erwähnte ähnliche Phänotypen im Adhäsionsverhalten der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta pga24$  unterstützen diese Annahme. Sap9 und Sap10 könnten als Schlüsselenzyme an der Prozessierung von Oberflächenproteinen beteiligt sein, welche im Adhäsionsprozess eine entscheidende Rolle spielen.

### **IV.3. Weitere Mitglieder der Sap Familie in *Candida albicans* und homologe Proteine in verwandten Organismen**

Zur Familie der sekretorischen Aspartatproteasen aus *C. albicans* zählen derzeit zehn Mitglieder. *In silico* Sequenzanalysen des *C. albicans* Genoms gaben Hinweise auf die Existenz eines weiteren möglichen Mitgliedes dieser Familie. Weitere, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass Sap9 und Sap10 sich von den anderen Mitgliedern der Sap Familie unter anderem durch eine GPI Verankerung unterscheiden. Somit handelt es sich um eine Familie extrazellulärer Aspartatproteasen, von denen acht, möglicherweise neun sekretiert und zwei mit der Zelloberfläche assoziiert vorliegen. Funktionell sind beide Untergruppen für die volle Ausprägung der Virulenz von Bedeutung, unterscheiden sich jedoch grundlegend. Den sekretorischen Proteasen wird eine Funktion bei der Gewebeerstörung durch Hydrolyse der Wirtproteine

zugeschrieben (Naglik *et al.*, 2004; Naglik *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu sind Sap9 und Sap10 durch wahrscheinliche Prozessierung pilzeigener Proteine für die Integrität der Zelloberfläche mitverantwortlich und von entscheidender Rolle im Adhäsionsprozess zwischen Pilz und Wirt.

Aufgrund ihrer Proteinsequenz und biochemischen Eigenschaften besteht eine starke Ähnlichkeit zwischen den Proteasen Sap9 und Sap10 und den Yapsinen aus *S. cerevisiae*. Man könnte Sap9 und Sap10 als die Yapsine von *C. albicans* bezeichnen. *S. cerevisiae* besitzt mindestens sieben Yapsine und nur eine sekretorische Aspartatprotease, Bar1, welche in den periplasmatischen Raum abgegeben wird und im „Mating“ – Prozess eine Rolle spielt. Somit ist es möglich, dass die sekretorischen Aspartatproteasen in *C. albicans* aus Sap9 und Sap10 hervorgegangen sind, bzw. sich aus weiteren ehemals vorhanden Yapsinen zu sekretorischen Proteasen entwickelt haben. Die Sekretion der Aspartatproteasen könnte demnach als eine evolutionäre Anpassung an die Anforderungen bei der Infektion und Interaktion mit dem Wirt betrachtet werden.

Aspartatproteasefamilien treten auch in anderen *Candida* Spezies auf. Hierbei handelt es sich jedoch stets um weniger als zehn Mitglieder. Aufgrund der hohen Bedeutung als Pathogen konzentrierten sich die Untersuchungen hauptsächlich auf *C. albicans*, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch in anderen *Candida* spp. weitere Mitglieder von Aspartatproteasefamilien identifiziert werden. Die geringere Anzahl bestimmter Virulenzfaktoren kann aber auch mitverantwortlich sein, für die Pathogenitätsunterschiede zwischen den einzelnen *Candida* Spezies. Vergleichende Genomanalysen haben gezeigt, dass die zu *C. albicans* sehr ähnliche Art *C. dubliniensis* keine zehn homologen SAP Gene besitzt (Moran *et al.*, 2004). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass *C. dubliniensis* zwar häufig bei oralen Infektionen isoliert wird, jedoch extrem selten für systemische Infektionen verantwortlich gemacht wird. Genetische Unterschiede könnten also aufzeigen, welche Faktoren für systemische Infektionen benötigt werden. Von der Untergruppe SAP4 bis SAP6, welche bei systemischen Infektionen von besonderer Bedeutung ist (Kretschmar *et*

*al.*, 1999; Sanglard *et al.*, 1997a), existiert in *C. dubliniensis* nur ein Gen, *CdSAP4* (Moran *et al.*, 2004). Demzufolge könnten die Gene *SAP4* bis *SAP6*, deren Proteinsequenzen zu mindestens 77% identisch sind, aus einem Gen entstanden sein, nachdem die evolutionäre Trennung in *C. albicans* und *C. dubliniensis* erfolgte. Alternativ, hat *C. dubliniensis* zwei der drei Gene nach der Auftrennung verloren und so seine Kapazität systemische Infektionen hervorzurufen eingebüßt.

Zu den Arten, welche aufgrund ihres zunehmenden Auftretens bei Infektionen von steigender medizinischer Bedeutung sind, gehört auch *C. parapsilosis*. Jüngste Untersuchungen konnten nachweisen, dass diese Art über mindestens drei sekretorische Aspartatproteasen verfügt (Dostal *et al.*, 2006). Auch für *C. tropicalis* und *C. guilliermondii* (Monod *et al.*, 1994) konnte die Existenz von Proteasenfamilien nachgewiesen werden. Biochemische Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die proteolytische Aktivität der Aspartatproteasen verschiedener *Candida* Arten stark variieren kann (Pichova *et al.*, 2001). Wobei eine ähnliche Spezifität, wie sie zum Beispiel zwischen den Proteasen aus *C. parapsilosis* (Sapp) und *C. lusitanae* (Sapl) besteht (Pichova *et al.*, 2001), Rückschlüsse auf die evolutionäre Entwicklung zulassen könnte. Eine ebenfalls beobachtete unterschiedliche Hemmung der verschiedenen Aspartatproteasen durch Proteaseinhibitoren (Pichova *et al.*, 2001) kann mit der Spezifität der jeweiligen Proteasen in Zusammenhang stehen.

Aspartatproteasen mit einer GPI Verankerung, wie es für Sap9 und Sap10 aus *C. albicans* gezeigt werden konnte, sind mit einer Ausnahme in anderen *Candida* Spezies nicht bekannt. Die Art *C. glabrata*, welche der Hefe *S. cerevisiae* näher steht als *C. albicans*, besitzt jedoch eine Familie GPI verankerter Aspartatproteasen. Diese werden aufgrund der starken Ähnlichkeit zu *S. cerevisiae* als Yapsine bezeichnet (Dujon *et al.*, 2004). Weitere Analysen haben gezeigt, dass die Yapsinfamilie von *C. glabrata* aus elf Mitgliedern besteht (Domergue and Cormack, 2006). Interessanter Weise liegen acht dieser elf Proteasen in einem Gencluster vor (Domergue and Cormack, 2006). Genclustern treten hauptsächlich bei Prokaryoten auf und

werden bei entsprechender virulenzassoziiertes Funktion der Genprodukte als Pathogenitätsinseln bezeichnet. Bei eukaryotischen Mikroorganismen wurden ebenfalls Pathogenitätsinseln vermutet, jedoch nur in seltenen Fällen nachgewiesen. Die *SAP* Familie von *C. albicans* bildet keine Gencluster. Lediglich *SAP1* und *SAP4* sind benachbarte Gene mit derselben Leserichtung. Alle anderen Mitglieder der *SAP* Familie befinden sich nicht in direkter Nachbarschaft auf zum Teil verschiedenen Chromosomen. *SAP4* bis *SAP6*, welche in Bezug auf Sequenz und Funktion der Genprodukte sehr ähnlich und möglicherweise evolutionär auseinander entstanden sind, bilden ebenfalls kein gemeinsames Gencluster.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Familie der sekretorischen Aspartatproteasen von *C. albicans* aus extrazellulär aktiven Mitgliedern besteht, welche sekretiert oder an der Zelloberfläche verankert werden. Verschiedene Subgruppen dieser Familie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Regulation und Spezifität. Auf diese Art ist der Pilz *C. albicans* an unterschiedliche Lebensräume und wechselnde Bedingungen als Kommensal oder im Verlauf einer Infektion des Wirtes angepasst.

#### IV.4. Weiterführende Arbeiten

Wichtigstes zukünftiges Ziel muss es sein, die natürlichen Substrate von Sap9 und Sap10 zu identifizieren. Das GPI verankerte Zellwandprotein Pga24 ist hierbei eines der wahrscheinlichsten Zielproteine, da die  $\Delta pga24$  Mutante ähnliche Phänotypen aufweist wie die Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$ , eine ausbleibende Prozessierung des Pga24 durch Kex2 nachgewiesen werden konnte, und die Prozessierung von Pga24 durch Pepstatin A gehemmt werden konnte (Granger *et al.*, 2005).

Die Identifizierung von Substraten der beiden Proteasen Sap9 und Sap10 wird weitere Einblicke in den genauen Mechanismus der Prozessierung ermöglichen. Damit wären Aussagen zu dem hochinteressanten unterschiedlichen Adhäsionsverhalten der Mutanten  $\Delta sap9$  und  $\Delta sap10$

möglich. Die Aufklärung der Rolle der beiden Proteasen während der Adhäsion, sowie der genaue Ablauf dieses Prozesses wären von großer Bedeutung für das Verständnis und die Behandlung von *Candida* Infektionen.