

# 1 Einleitung

*Candida albicans* wurde zum ersten Mal von Berkhout (Robin) im Jahre 1923 taxonomisch in die Gattung *Candida* eingruppiert [zitiert in van Uden and Buckley, 1970]. Zur Gattung *Candida* zählen derzeit zwischen 150 und 200 Spezies, von denen nur ein kleiner Anteil als humanpathogen angesehen wird [Odds, 1987; Wade, 1993].

In der Regel besiedelt *Candida albicans* die Haut und die Schleimhäute des Menschen und anderer Warmblüter als Kommensale, jedoch wurden Vertreter der Gattung *Candida* in den vergangenen Jahren zunehmend als Verursacher schwerer klinischer Erkrankungen gefunden. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass *Candida albicans* der häufigste Erreger von Pilzkrankungen des Menschen ist. Neben *C. albicans* werden jedoch immer häufiger auch Non-*albicans-Candida*-Stämme als Krankheitserreger beschrieben.

*Candida*-Infektionen stellen vor allem bei immungeschwächten Patienten (wie z. B. HIV-Infizierten oder Organtransplantierten) ernsthafte Probleme dar. Neben solchen Wirtsfaktoren beeinflussen die Eigenschaften der *Candida* die klinische Ausprägung der Infektion in entscheidendem Maße.

## 1.1 Taxonomie

Hefen können sich durch die Art und Weise ihrer Vermehrung unterscheiden: sexuell (teleomorph) oder asexuell (anamorph). In älteren Taxonomien werden die sich asexuell vermehrenden Spezies der Gattung *Candida* den Deuteromyzeten (auch imperfekte Hefen) zugeordnet. *Candida*-Spezies mit bekannter sexueller Vermehrungsform werden bei den Ascomyzeten eingeordnet. Neuere phylogenetische Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch die asexuelle Form der *Candida* spp. eher den Ascomyzeten zuzuordnen ist (Tabelle 1.1). Die wichtigsten pathogenen *Candida*-Spezies sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst; dabei sind den anamorphen Formen die bisher beschriebenen teleomorphen Formen gegenübergestellt. Für die wichtigsten humanpathogenen Pilze (wie z. B. *C. albicans*) konnten bisher keine sexuellen Stadien beschrieben werden (vergleiche Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.1:**

Taxonomische Eingruppierung der Gattung *Candida* (s. auch Tabelle 1.2). Die Teleomorphe *Kluyveromyces marxianus*, *Issatchenkia orientalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii* und *Pichia jadinii* (s. auch Tabelle 1.2) werden nach Kurtzman und Fell (1998) in die Familie der Saccharomycetaceae und *Clavisopora lusitaniae* in die Familie der Metschnikowiaceae eingruppiert.

Stamm: Ascomycota
Klasse: Hemiascomycetes
Ordnung: Saccharamycetales
Familie: Metschnikowiaceae
Genus: <i>Clavispora</i>
Familie: Saccharomycetaceae
Genus: <i>Saccharomyces</i>
<i>Kluyveromyces</i>
? <i>Issatchenkia</i>
? <i>Debaryomyces</i>
? <i>Pichia</i>
Familie: Candidaceae
Genus: <i>Candida</i>

Die klassische, auf Morphologie und Wachstumseigenschaften beruhende Einteilung von Hefen ist aufgrund wechselnder Morphologie und Kolonieformen, Fehlen sexueller Reproduktion oder Selbstbefruchtung und des Fehlens morphologischer Eigenschaften (keine echten Hyphen oder Chlamydosporen) nicht leicht festzulegen. Darüber hinaus erschweren unbekannte Mutationsraten DNA-Hybridisations-Experimente. All diese Probleme machen es notwendig, moderne Methoden zur Klassifizierung dieser Organismen zu nutzen: hierzu gehören z. B. Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (RFLP), der PCR-Fingerprint und die Sequenzierung.

**Tabelle 1.2:**

Die wichtigsten pathogenen *Candida*-Spezies und deren bisher bekannte sexuelle Formen (Klassifizierung s. auch Tabelle 1.1) (modifiziert nach Calderone, 2002b).

Anamorphe (asexuelle) Form	Teleomorphe (sexuelle) Form
<i>C. albicans</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. dubliniensis</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. tropicalis</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. glabrata</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. parapsilosis</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>C. viswanathii</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavisopora lusitaniae</i>
<i>C. famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>C. inconspicua</i>	bisher nicht beschrieben
<i>C. utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>

## 1.2 Genetik

Das Genom von *C. albicans* ist diploid; es besteht aus acht Chromosomenpaaren (Chromosomen 1–7 und R). Die Chromosomen 1–7 haben eine konstante Länge (jeweils zwischen 1000 und 3400 kbp), wohingegen das Chromosom R in seiner Länge zwischen 3200 und 4000 kbp variiert [Magee and Chibana, 2002; [www.ncbi.nih.gov/b](http://www.ncbi.nih.gov/b)]. Insgesamt ergibt sich somit eine Genomgröße von ca. 32 000 kbp.

Auffallende Eigenschaften von *C. albicans*-Stämmen sind das Auftreten von Aneuploidie, Translokationen, Deletionen und Längenpolymorphismen, die unter dem Begriff der genomischen Variabilität zusammengefasst werden. Solche karyotypischen Alterationen treten im Rahmen von Adaptationen auf; sie können zu Änderungen im Phänotyp führen.

Eine Besonderheit von *Candida*-Spezies ist eine Abweichung vom universellen genetischen Drei-Buchstaben-Code der Eukaryoten. Das Kodon CUG in der mRNA kodiert nämlich in den meisten Organismen die Aminosäure Leucin, in *C. albicans* und in allen bisher untersuchten *Candida*-Spezies jedoch Serin [Ohama et al., 1993; Sullivan et al., 2002; [www.ncbi.nlm.nih.gov/a](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/a)].

## 1.3 Biologie

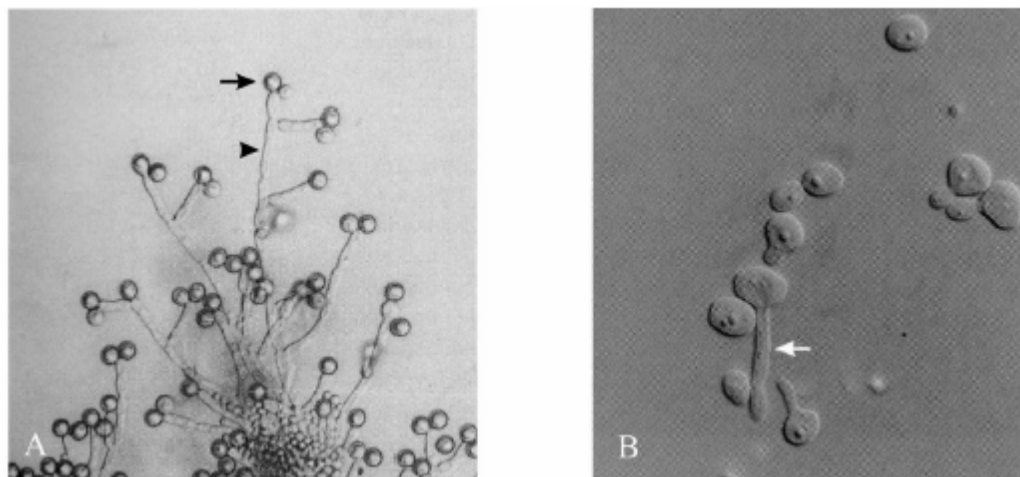
Mitglieder der Gattung *Candida* in der Familie der Candidaceae stellen eine heterogene Gruppe von Mikroorganismen dar, die sowohl als Hefezellen als auch als Hyphen wachsen können. Daher sprechen wir auch von einem *Dimorphismus*. Die meisten *Candida*-Spezies sind saprophytische Umweltkeime, nur wenige von ihnen wurden bisher mit Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang gebracht. Etwa 65 % der bisher bekannten *Candida*-Spezies können sich nicht bei einer Temperatur von 37 °C vermehren. Die Fähigkeit zur Vermehrung bei Temperaturen um 37 °C ist ein Faktor, der die Pathogenität von *Candida*-Arten mitbestimmt [Calderone, 2002a].

*Candida*-Spezies wachsen in der Regel als Hefe-Zellen mit typischer Sprossung (Blastokonidien), können jedoch unter bestimmten Bedingungen auch als fadenförmige Formen, sogenannte Pseudohyphen, wachsen (Dimorphismus). *C. albicans* und *C. dubliniensis* können darüber hinaus auch echte Hyphen entwickeln und werden daher auch als polymorph bezeichnet. Pseudohyphen entstehen aus Hefezellen oder Hyphen durch Knospung, die neu entstandenen Zellen bleiben dabei mit den Elternzellen verbunden und elongieren.

Als ein morphologisches Merkmal der Pseudohyphen werden die Einschnürungen im Bereich der Zellwandbildung zwischen den Zellen angesehen. Ein Geflecht von Pseudohyphen bezeichnet man als Pseudomyzel. Echte Hyphen bilden sich aus den Hefezellen oder als

Verzweigungen existierender Hyphen (Myzel) und weisen diese Einschnürungen nicht auf. Durch kontinuierliche Verlängerungen der Zellwand der Hefezellen entstehen Keimschläuche, die eine Übergangsphase zwischen Hefe und Myzelform darstellen.

Hefe-Zellen sind 4–8 µm große, eukaryotische Mikroorganismen, deren Wachstum von der Temperatur und dem pH-Wert abhängt, nicht aber vom Nährstoffgehalt des Mediums. Zur Vermehrung sind Temperaturen zwischen 20 °C und 38 °C und ein pH-Wert zwischen 2,5 und 7,5 erforderlich. Bei einem pH-Wert < 6,5 und Temperaturen < 35 °C sowie in Gegenwart von Glucose und Ammoniumsalzen als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle findet das Wachstum überwiegend als Hefe statt. Die *in-vitro*-Ausbildung von Hyphen wird durch folgende Bedingungen induziert: Temperatur über 35 °C, pH-Wert größer 6,5, Stickstoff-, Kohlenstoff- oder Sauerstoffmangel und durch den Zusatz von Serum oder bestimmter chemischer Substanzen wie GlcNAc, Prolin und Alkohole zum Medium.



**Abbildung 1.1:**

A: Filamente (▶) und Chlamydosporen (➔) auf Reisagar (Hellfeld-Verfahren × 250);

B: Keimschlauchbildung (◀) [Barnett et al., 2000].

*C. albicans* und *C. dubliniensis* besitzen zudem die Fähigkeit, *in vitro* auf nährstoffarmen Medien Chlamydosporen zu bilden. Chlamydosporen sind 8–12 µm große, runde, dickwandige Dauerformen an den Enden der Pseudomyzelien (siehe Abbildung 1.1 A). Ihre Bildung kann auf geeigneten Mangel-Nährböden, z. B. auf Reisagar, induziert werden [Rinaldi, 1993]. Die Rolle der Chlamydosporen im Lebenszyklus der Hefen ist unklar; nach den bisherigen Erkenntnissen werden sie als nicht besonders widerstandsfähig angesehen.

Sowohl die Keimschlauchbildung in Gegenwart von Serum als auch die Bildung von Chlamydosporen auf Reisagar werden zur Differenzierung von *Candida* spp. herangezogen.

Unter bestimmten Voraussetzungen kann jedoch auch bei *C. tropicalis* eine Chlamydosporenbildung beobachtet werden [Calderone, 2002b] (siehe Tabelle 1.3 und Abbildung 1.1 B).

**Tabelle 1.3:**

Morphologische Eigenschaften ausgewählter pathogener *Candida* Spezies. Aufgeführt sind die Bildung von Chlamydosporen auf Mangelmedien und die Fähigkeit zur Entwicklung von Keimschläuchen/Hyphen sowie Pseudohyphen (+ für Ausbildung der Eigenschaft, +/- Ausbildung nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen, – keine Ausbildung) (modifiziert nach Calderone, 2002b).

Spezies	Chlamydosporen	Keimschlauch/ Hyphen	Pseudohyphen	Größe der Hefe (µm)
<i>C. albicans</i>	+	+	+	4–6 x 6–10
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	3–7 x 3–14
<i>C. tropicalis</i>	-/+	–	+	4–8 x 5–11
<i>C. glabrata</i>	–	–	-/+	1–4
<i>C. parapsilosis</i>	–	–	+	2,5–4 x 2,5–9
<i>C. krusei</i>	–	–	-/+	3–5 x 6–20
<i>C. guilliermondii</i>	–	–	+	2–5 x 3–7
<i>C. lusitaniae</i>	–	–	+	2–6 x 3–10
<i>C. kefyr</i>	–	–	+	2,5–5 x 5–10
<i>C. inconspicua</i>	–	–	+	1,5–3 x 3–5
<i>C. famata</i>	–	–	+	3,7–5 x 2,7–4,7

#### 1.4 Klinische Bedeutung von *Candida*-Infektionen

Spezies der Gattung *Candida* und insbesondere *C. albicans* sind die am besten untersuchten humanpathogenen Pilze. *C. albicans* siedelt als Kommensale vor allem auf den Schleimhäuten des Nasen-Rachen-Raums, der Vagina, der äußeren Geschlechtsorgane und des Magen-Darm-Traktes des Menschen. Bei gesunden Personen ist *C. albicans* zu einem hohen Prozentsatz von den Schleimhäuten anzüchtbar oder mit Nukleinsäure-Nachweissystemen wie der PCR nachweisbar, ohne dass er im mikroskopischen Direktpräparat sofort auffällt.

Infektionen (Candidosen) werden vor allem durch *C. albicans*, seltener durch andere Spezies, z. B. *C. parapsilosis*, *C. glabrata* oder *C. tropicalis*, hervorgerufen. Die Erkrankung zeigt sich in zwei Formen: der oberflächlichen und der invasiv disseminierten Candidose. *C. albicans* kann praktisch jedes Gewebe im menschlichen Körper befallen. Die bei weitem häufigste Manifestation ist die oberflächliche Läsion von Schleimhäuten. In den meisten Fällen entstehen die gefährlicheren invasiven Formen durch Streuung von oberflächlichen Läsionen, obwohl Hefen auch durch kontaminiertes intravenös angewendetes Material (z. B. zentralvenöser Katheter) direkt in den Blutstrom gelangen können [Shepherd et al., 1985]. *Candida* spp. stellen

insbesondere bei der Versorgung von neutropenischen Patienten und solchen mit HIV<sup>1</sup>/AIDS<sup>2</sup> ein großes Problem dar. Die systemische Infektion ist mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert. 30–40 % der Patienten mit einer nachgewiesenen Infektion im Blut versterben [Cheng et al., 2005].

In den vergangenen Jahren wurde vor allem bei immunsupprimierten und nosokomial infizierten Patienten beobachtet, dass neben *C. albicans* zunehmend auch andere *Candida*-Spezies isoliert werden. So wird zum Beispiel bei AIDS-Patienten häufig *C. dubliniensis* nachgewiesen, und bei nosokomial erworbenen Infektionen werden neben *C. albicans* zunehmend weitere non-*albicans*-*Candida*-Spezies wie *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* und *C. krusei* isoliert [Rinaldi, 1993]. Eine Erklärung für die Änderung in der Isolationshäufigkeit verschiedener *Candida*-Spezies wird darin gesehen, dass durch den Einsatz von Antimykotika, wie z. B. Fluconazol, eine Selektion resistenter *Candida*-Spezies stattfindet. Diese Hypothese wird durch die MIC<sup>3</sup>-Werte der verschiedenen antimykotisch wirkenden Substanzen für verschiedene *Candida*-Spezies belegt, die zeigen, dass *C. albicans* sensibel gegenüber verschiedenen Antimykotika ist, während andere Erreger bei den eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen resistent sind (Übersichtsarbeit Sanglard and Bille, 2002). Änderungen in der Isolationshäufigkeit verschiedener *Candida*-Spezies wurden auch in Deutschland beobachtet und auf den Einsatz verschiedener Antimykotika zurückgeführt [Rüchel et al., 2002]. Um die adäquate Chemotherapie einleiten zu können, ist es daher notwendig, geeignete diagnostische Verfahren einzusetzen, die eine Infektion mit hoher Sensitivität nachweisen und die entsprechende *Candida*-Spezies identifizieren können.

Die Methoden zur Charakterisierung von *Candida*-Isolaten sind in den zurückliegenden Jahren immer mehr verfeinert worden. Dies führte auch zur Etablierung neuer *Candida*-Spezies wie *C. dubliniensis*, die ursprünglich als atypische Variante von *C. albicans* angesehen wurde [Sullivan et al., 1995].

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den vergangenen Jahren begonnen, *Candida*-Isolate aus verschiedenen Regionen sowohl mit klassischen Labormethoden, wie Wachstum auf verschiedenen Nährmedien, Verwertung von verschiedenen Substraten sowie Keimschlauchbildung, als auch mit molekularbiologischen Methoden zu charakterisieren [Tietz et al., 1995; Schönian et al., 1996; McCollough et al., 1999; Forche et al., 1999; Pinto de Andrade et al., 2000]. Untersuchungen von Patienten-Isolaten mit lokalisierten und systemischen *Candida*-

---

<sup>1</sup> HIV: Human Immunodeficiency Virus

<sup>2</sup> AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

<sup>3</sup> MIC: Minimal Inhibitory Concentration (minimale Hemmkonzentration)

Infektionen haben ergeben, dass die Kolonisierung des Patienten mit *Candida* einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Candidose darstellt und dort die häufigste Ursache für eine Infektion liegt [Schönian et al., 1993; Übersichtsarbeit: Sullivan and Coleman, 2002]. Jedoch wurden auch Fälle von systemischer Candidose gefunden, die eine exogene Ursache hatten [Schönian et al., 1993]. Es wird angenommen, dass die meisten Menschen einen einzelnen Stamm der *Candida* spp. an verschiedenen Orten des Körpers für lange Zeit tragen. Einzelne Individuen können auch mehr als eine Spezies oder einen Stamm der Gattung *Candida* zur gleichen Zeit beherbergen, was bei hospitalisierten und immunsupprimierten Patienten häufiger vorkommt [Odds, 1987; Schönian et al., 1993].

### **1.5 Pathogenität und Virulenzfaktoren**

Bevor eine Infektion durch einen opportunistischen Keim ausgelöst wird, muss er die Immunabwehr überwinden, im Wirt überleben und sich vermehren und schließlich neue Gewebe befallen. Candidosen können an unterschiedlichen Lokalisationen, z. B. Gefäßsystem, Vagina oder Mundschleimhaut, im Menschen auftreten. Jeder dieser Orte hat sein spezifisches Milieu, das u. a. durch pH-Wert und Nährstoffangebot charakterisiert wird. Dieses Milieu beeinflusst die Vermehrung der *Candida*-Zellen. *C. albicans* exprimiert im Blut oder Gewebe PHR1 (engl.: *pH-regulated gene*) um sich an den neutralen pH anzupassen, während es in der Vagina PHR2 ausbildet, um das saure Milieu zu überleben [Mühlschlegel and Fonzi, 1997]. Das Ausmaß von Kolonisation oder Infektion hängt von den Eigenschaften des Pilzes und den Wirtsfaktoren, vermutlich sogar stärker vom Immunstatus des Wirts, ab als von der Ausbildung der bekannten Virulenzfaktoren durch den jeweiligen Erreger. Begünstigende Faktoren für eine Infektion sind Schwangerschaft, Säuglings- oder Greisenalter, Stoffwechselerkrankungen (z. B. Diabetes mellitus), konsumierende Erkrankungen (z. B. Leukosen, Agranulozytosen, Tumore), protrahierte Infektionen und operative Maßnahmen, zu denen auch das Legen von Trachealkanülen und Venenkathetern gerechnet wird. Diese Faktoren führen oft zu einer Suppression des Immunsystems oder werden häufig bei Patienten mit deutlicher Resistenzminderung durchgeführt. In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass *C. albicans* das am häufigsten nachgewiesene Pathogen bei AIDS-Patienten (Schleimhauterkrankungen) sowie bei Sepsis in Verbindung mit Chemotherapie bei Tumoren, Transplantationen, bei Frühgeborenen, bei Infektionen nach Operationen und anderen prädisponierenden Konditionen ist.

Zu den Virulenzfaktoren bei *Candida*-Arten zählen u. a. morphologisch-mikroskopisch erkennbare Merkmale, wie die Keimschlauchbildung, proteolytische Enzyme, die Induktion von

Phospholipasen und Adhärenzfaktoren. Die Anheftung der Erreger an Oberflächen des Organismus erfolgt über Adhäsine und wird als notwendiger Schritt in der Etablierung einer Infektion angesehen. Bei *Candida*-Spezies wurden mehrere Adhäsine (gewöhnlich Polysaccharide oder Glykoproteine) beschrieben, die an verschiedene Zellen oder Gewebe bzw. an Wirtsfaktoren, wie Mucin, binden können. Die Bindung der Hefen an Rezeptoren auf der Oberfläche von Geweben ist eine Voraussetzung für die Kolonisation der Erreger. So konnte z. B. gezeigt werden, dass bei einigen *Candida*-Stämmen die Bindung an epitheliale Zellen durch vorherige Inkubation der Hefezellen mit Fucose bzw. N-Acetylglucosamin (GlcNAc) gehemmt werden kann. Eine Vorbehandlung mit Lektinen mit einer Spezifität für Fucose bzw. GlcNAc führte zum gleichen Ergebnis. Das weist darauf hin, dass Glykoproteine oder Glykolipide mit endständigen Fucose oder GlcNAc-Resten bei der Bindung von *Candida*-Spezies an humane Zellen eine wichtige Rolle spielen [Critchley and Douglas, 1987].

Man vermutet, dass Änderungen in der Morphologie von *C. albicans*, wie z. B. der Übergang von der Hefe- in die Myzelform, mit Änderungen im Expressionsmuster von Proteinen einhergehen. Durch Untersuchungen des mRNA-Expressionsmusters, u. a. mit Hilfe von Genchips, konnten in Abhängigkeit von der Wuchsform Unterschiede in der Expression zahlreicher Gene belegt werden [Naglik et al., 2003, Kadosh and Johnson, 2005]. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass für das invasive Wachstum extrazelluläre Hydrolasen, Phospholipasen, Proteinasen und Lipasen eine wesentliche Rolle spielen.

Gut untersucht sind die sekretorischen Aspartat-Proteinasen (SAPs). Bisher sind 10 verschiedene SAPs bei *C. albicans* beschrieben, deren Funktionen bei der Invasion und der Pathogenese noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt sind [Hube, 1998; Naglik et al., 2003]. Phospholipasen (bisher sind zwei Gene für Phospholipase B identifiziert) scheinen ebenfalls eine Rolle beim invasiven Wachstum zu spielen. Analog zu der SAP-Familie wurden zehn Gene für Lipasen identifiziert. Über die Funktion der Lipasen bei *C. albicans* ist bisher allerdings wenig bekannt. Weitere Proteinasen scheinen ebenfalls die Virulenz zu fördern (für eine Übersichtsarbeit zu diesen Klassen von Pathogenitätsfaktoren siehe [Hube and Naglik, 2002]).

Die Invasion in das Gewebe wird durch die Umwandlung von der Hefezelle in die fadenförmige Wachstumsform (Morphogenese) begünstigt [Calderone and Fonzi, 2001]. Das Efg1p-Protein als ein Transkriptionsfaktor ist ein wichtiger Regulator in *C. albicans*, der nicht nur den Wechsel zwischen Hefe und Hyphe beeinflusst [Lo et al., 1997; Stoldt et al., 1997], sondern auch die Chlamydosporen-Bildung [Sonneborn et al., 1999b] und das *phenotypic switching* [Sonneborn et al., 1999a] reguliert. Doppel-Mutanten (z. B. *cph1/cph1 efg1/efg1*) in *C. albicans* haben die Fähigkeit zum fadenförmigen Wachstum verloren. Diese Mutanten sind im Tiermodell avirulent



[Lo et al., 1997]. Experimente mit den für das fadenförmige Wachstum verantwortlichen Genen, lassen vermuten, dass nur Stämme, die sowohl Hefezellen als auch Hyphen bilden können, in der Lage sind, in ein vitales Organ einzudringen [Yang, 2003]. Das Vermögen, den Phänotyp zu ändern, wird als *phenotypic switching* bezeichnet. *Phenotypic switching* wurde intensiv untersucht und wird als ein Virulenzfaktor angesehen. Jedoch sind die grundlegenden Mechanismen der Phänotypänderung und deren Rolle als Virulenzfaktoren nicht klar. *Phenotypic switching* wird mit Änderungen der Expression von Oberflächen-Antigenen, der Gewebsaffinität des Organismus, der Enzymproduktion und der Sensibilität gegenüber Antimykotika assoziiert. Die Änderung des Phänotyps wird als Versuch des Organismus gesehen, sich an die unterschiedlichen Standortbedingungen im Körper anzupassen und Resistenzen gegen Medikamente zu entwickeln [Soll et al., 1989; Vargas et al., 2000].

Die Änderung von Oberflächeneigenschaften hilft *Candida* ssp. dem Immunsystem zu entgehen. Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass alle genannten Faktoren zusammen mit bisher unbekanntem Virulenzmechanismen zur Progression der Krankheit beitragen.

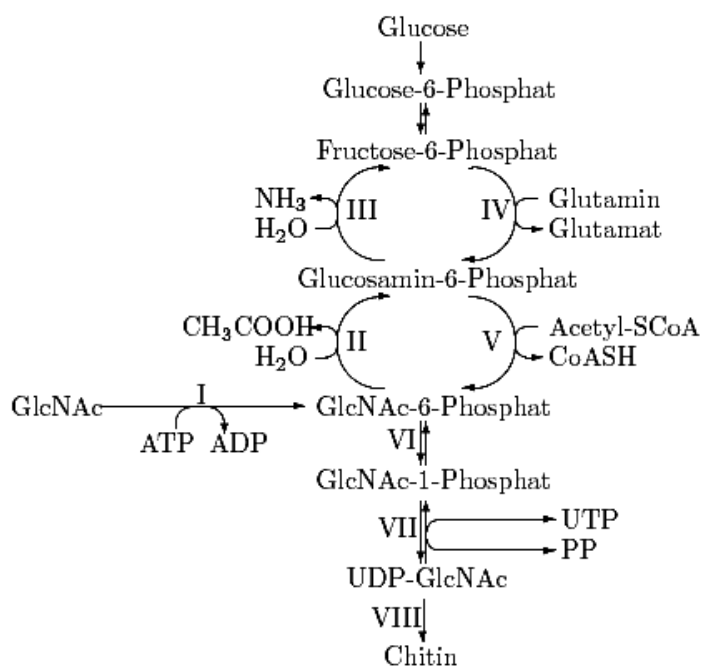
## **1.6 N-Acetylglucosamin- und Glucosamin-Stoffwechsel**

Im Allgemeinen sind Aminozucker Bestandteile von Glykolipiden, -proteinen und Polysacchariden und spielen eine wichtige Rolle in der Zellwand-Biosynthese. Der Aminozucker N-Acetylglucosamin (GlcNAc) ist für den Lebenszyklus von *C. albicans* essentiell. GlcNAc kann als alleinige Energiequelle dienen und wird für die Bildung von Chitin benötigt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass GlcNAc als Rezeptor für die Kolonisierung der Hefen auf Schleimhäuten dienen kann und *in vitro* die Keimschlauchbildung induziert. Da *C. albicans* vor allem auf Schleimhäuten wächst, die reich an GlcNAc und Glucosamin (GlcN) sind [Datta et al., 1989], wird spekuliert, dass dieser Aminozucker auch *in vivo* eine wichtige Rolle für *C. albicans* spielt.

Der Stoffwechsel-Weg von GlcNAc und GlcN in *C. albicans* ist bekannt [Corner et al., 1986; Datta et al., 1989; Gopal et al., 1982; Singh and Datta, 1979a; Singh and Datta, 1979b]. Die Aufnahme des GlcNAc durch *C. albicans* erfolgt zunächst über ein konstitutiv exprimiertes Aufnahmesystem. Danach erfolgt die Induktion des GlcNAc-spezifischen Aufnahmesystem, der N-Acetylglucosamin-Permease sowie der Enzyme N-Acetylglucosamin-Kinase, N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase und Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA). Die Enzyme N-Acetylglucosamin-Kinase und N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase wandeln GlcNAc zu Glucosamin-6-Phosphat um (Abbildung 1.2). D. Comb und S. Roseman untersuchten

das Enzym GNPDA des GlcN-Stoffwechsels bei *E. coli* und beim Schwein und wiesen nach, dass dieses Enzym die Umwandlung von GlcNAc zu Fructose-6-Phosphat katalysiert [Comb and Roseman, 1958]. GlcNAc wird aber nicht nur als Nährstoff resorbiert, sondern kann auch von der Zelle aus Fructose-6-Phosphat produziert werden.

Glucosamin wird über einen unspezifischen Glucose/H<sup>+</sup>-Co-Transporter aktiv in die Zelle aufgenommen und anschließend mit einer Glucosamin-Kinase phosphoryliert. Das Produkt dieser Reaktion ist ebenfalls Glucosamin-6-Phosphat. GNPDA katalysiert die Reaktion von Glucosamin-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat, dieses Enzym ist somit für den Stoffwechsel beider Aminozucker notwendig.



**Abbildung 1.2:**

Schematische Darstellung des Stoffwechsels von GlcNAc und der Synthese von Chitin (die römische Zahl gibt das Enzym an, das die Reaktion vermittelt):

- I: N-Acetylglucosamin-Kinase; II: N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase;  
 III: Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase; IV: Glutaminfructose-6-Phosphat-Aminotransferase;  
 V: Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase; VI: Phosphoacetyl-Glucosamin-Mutase;  
 VII: UDP-N-Acetylglucosamin-Phosphorylase; VIII: Chitin-Synthase,  
 entnommen aus [Gopal et al., 1982].

Die Regulation der Enzyme, die GlcNAc zu Fructose-6-Phosphat umwandeln, wurde in *C. albicans* genauer untersucht [Biswas et al., 1979; Gopal et al., 1982; Singh and Datta, 1979a]. Insgesamt werden sechs Gene über GlcNAc reguliert (GlcNAc-Regulon), die von Yamada-Okabe und Mitarbeitern als CaNAG1 bis CaNAG6 bezeichnet werden [Yamada-Okabe et al.,

2001]. Untersuchungen von Kumar et al. zeigen, dass NAG1 transkriptional durch GlcNAc induziert wird. Weitere Experimente dieser Arbeitsgruppe ergaben, dass das NAG1 einen gemeinsamen, bidirektionalen Promotor mit dem Gen DAC1 (N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase) hat, welcher in unterschiedliche Richtungen agiert [Kumar et al., 2000]. Ein Promotor ist der DNA-Bereich eines Gens, der den Startpunkt für das Umschreiben des Gens in mRNA markiert. Das ist der erste Schritt der Proteinsynthese (Transkription). Zudem regulieren Promotoren die Effizienz der Transkription und damit die Menge des gebildeten Eiweißes.

## 1.7 Aufgabenstellung

Immer wieder wird von *C. albicans*-Isolaten berichtet, die nicht den typischen Phänotyp (siehe Tabelle 1.3) von *C. albicans* ausbilden. Diese atypischen *C. albicans* wachsen bei 37 °C langsamer und sind nicht in der Lage, Chlamydosporen zu bilden. Im Gegensatz zu den typischen *C. albicans* können sie die Aminosucker GlcN und GlcNAc nicht assimilieren. Der Serum-Keimschlauchtest ist positiv, wobei einige Stämme erst nach langer Inkubationszeit Pseudohyphen bilden. In dieser Arbeit werden atypische *C. albicans*-Isolate untersucht, die aus Vaginalabstrichen von Frauen aus Madagaskar und Angola isoliert wurden. Weil nur pathogene *Candida*-Spezies GlcNAc verwerten können, wird vermutet, dass der GlcNAc-Stoffwechsel in Verbindung zur Virulenz steht [Singh and Datta, 1979b; Natarajan and Datta, 1993]. Die hier untersuchten GlcN- und GlcNAc-negativen *C. albicans*-Stämme waren teilweise in der Lage eine Vaginitis hervorzurufen. Tietz et al. untersuchten *C. albicans*-Stämme aus Angola und Madagaskar, wobei 80 % der mit typischen *C. albicans*-Stämmen infizierten Patientinnen eine Vaginitis hatten, während es bei den atypischen Stämmen nur 47 % waren [Tietz et al., 1995]. Dies weist auf eine verminderte Virulenz bei *C. albicans*-Stämmen hin, die nicht in der Lage sind, GlcNAc zu verwerten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Mutationen im NAG1-Gen, welches die GNPDA kodiert, oder nach Veränderungen in der Genexpression, die die mangelnde Assimilation von GlcNAc und GlcN in den atypischen Stämmen erklären könnten.

Legt man den Stoffwechselweg zur Metabolisierung von GlcN und GlcNAc zu Grunde (siehe Abschnitt 1.6; Abbildung 1.2), so liegt die Vermutung nahe, dass ein Defekt im Enzym bzw. im Gen, das für die Desaminierung von Glucosamin-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat notwendig ist, für die fehlende Assimilation verantwortlich sein könnte. GNPDA ist das letzte Enzym des Aminosucker-Stoffwechsels. Das Substrat der GNPDA ist das Glucosamin-6-Phosphat, welches als Abbauprodukt sowohl aus dem GlcN- als auch aus dem GlcNAc-Stoffwechsel entsteht. GlcNAc ist in der Lage, Enzyme des GlcNAc-Stoffwechsels (namentlich GNPDA,

N-Acetylglucosamin-Kinase, N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase) zu induzieren. Durch die Aktivitätsbestimmung der GNPDA mit und ohne Induktion durch GlcNAc sollte untersucht werden, ob typische und atypische *C. albicans* Unterschiede in den Enzymaktivitäten bzw. in der Induktion des Enzyms aufweisen.

Die Bildung von NAG1-mRNA kann durch GlcNAc induziert werden [Singh and Datta, 1979a; Natarajan and Datta, 1993], aber auch in Zellen, die auf Glucose gewachsen sind, gibt es nachweisbare Konzentrationen von NAG1-mRNA [Yamada-Okabe et al., 2001]. Das GNPDA-Gen wird transkriptional reguliert [Singh and Datta, 1979b; Kumar et al., 2000]. Untersuchungen zur mRNA-Synthese sollten daher zeigen, ob die Induktion mit GlcNAc eine unterschiedliche Zunahme der spezifischen mRNA bei typischen und atypischen *C. albicans* hervorruft.

Die Chlamydosporenbildung in *C. albicans* ist abhängig von Efg1p (*enhanced filamentous growth protein*), welches den Übergang von Hefe zu Hyphen reguliert. Sonneborn et al. [Sonneborn et al., 1999a] zeigten, dass Efg1p-negative Mutanten nicht in der Lage waren, Chlamydosporen zu bilden. Da die hier untersuchten atypischen *C. albicans*-Stämme keine Chlamydosporen ausbilden konnten, sollte geprüft werden, ob sich mRNA von Efg1p nachweisen lässt und ob Unterschiede in der Expression bei den typischen und atypischen Stämmen nachweisbar sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, anhand der publizierten Sequenz des NAG1 [Natarajan and Datta, 1993] spezifische PCR-Primer zu entwickeln, um bei typischen und atypischen *C. albicans*-Stämmen nach eventuellen Unterschieden in der Sequenz, die das Enzym GNPDA kodiert, zu suchen. Dabei sollte zunächst ein Screening auf Mutationen in den entsprechenden PCR-Produkten mit Hilfe von SSCP-Analysen durchgeführt werden. Bei unterschiedlichen SSCP-Mustern sollten dann die entsprechenden DNA-Abschnitte sequenziert werden, um die zu Grunde liegenden Mutationen zu identifizieren. Die ermittelten DNA- und Aminosäure-Sequenzen der typischen und atypischen *C. albicans* sollten anschließend verglichen und für phylogenetische Analysen genutzt werden.