

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulare Charakterisierung des Glucosamin-6-Phosphat-
Desaminase-Gens (NAG1) in *C. albicans*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Pauli

aus Köln

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Presber
2. Prof. Dr. R. Rüchel
3. Prof. Dr. med. Seyfarth

Datum der Promotion: 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	3
II.	Abbildungsverzeichnis	5
III.	Tabellenverzeichnis	6
IV.	Abkürzungsverzeichnis	7
1	Einleitung	9
1.1	Taxonomie	9
1.2	Genetik	11
1.3	Biologie	11
1.4	Klinische Bedeutung von <i>Candida</i> -Infektionen	13
1.5	Pathogenität und Virulenzfaktoren	15
1.6	N-Acetylglucosamin- und Glucosamin-Stoffwechsel	17
1.7	Aufgabenstellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Puffer und Lösungen	21
2.1.2	Gel-Lösungen	22
2.1.3	Färbelösungen	23
2.1.4	Nährlösungen und Nährmedien	23
2.2	Untersuchungsmaterial	24
2.3	Stammanzucht	25
2.3.1	Stammhaltung und normale Anzucht	25
2.3.2	Stammanzucht für RNA-Extraktion und Enzymaktivitätsbestimmung	25
2.4	Bestimmung der Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA)	25
2.5	DNA-Präparation-Cetylmethylammoniumbromide (CTAB)-Minipräparation [Gardes and Bruns, 1993]	26
2.6	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.6.1	Primer-Optimierung	28
2.6.2	PCR-Bedingungen und Analyse der PCR-Produkte	29
2.7	RNA-Extraktion	30
2.8	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	30
2.9	Durchführung der RT-PCR zur Amplifizierung der mRNA	31
2.10	Single-Strand-Conformation-Polymorphisms-Analyse (SSCP)	32
2.11	Radioaktive Sequenzierung des NAG1	32
2.12	Vorbereitung der PCR-Produkte für die Sequenzierung	32
2.12.1	Analyse der Sequenzieransätze im PAA-GT-Gel	34
2.12.2	Analyse der NAG-Sequenzen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase bei typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Stämmen	35
3.2	Analyse der NAG1-Expression in typischen und atypischen <i>C. albicans</i> - Stämmen	36
3.3	Sequenzanalyse des NAG1 für <i>C. albicans</i> -Stämme mit normalem und typischem Biotyp	38
3.3.1	SSCP-Analysen	38
3.3.2	DNA-Sequenzanalysen	41
3.3.3	Stammvergleiche zwischen typischen und atypischen <i>C. albicans</i>	44

4	Diskussion	48
4.1	Enzymaktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA)	49
4.2	Expression des NAG1-Gens in typischen und atypischen Stämmen	50
4.3	Analyse der NAG1-Sequenzen bei typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Stämmen	51
4.4	Phylogenetische Untersuchungen	53
4.5	GlcNAc-Stoffwechsel und Virulenz	55
5	Zusammenfassung	56
6	Literaturverzeichnis	58
	Anhang A	63
	Danksagung	75
	Erklärung	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: A: Filamente (▶) und Chlamydosporen (➔) auf Reisagar (Hellfeld-Verfahren × 250); B: Keimschlauchbildung (◀) [Barnett et al., 2000]	12
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Stoffwechsel von GlcNAc und der Synthese von Chitin entnommen aus [Gopal et al., 1982]	18
Abbildung 3.1: Enzymaktivität der GNPDA mit (+) und ohne Induktion durch GlcNAc	35
Abbildung 3.2: Expression des Genes EFB1, mit (+) und ohne (-) Induktion durch GlcNAc.	36
Abbildung 3.3 Expression der Gene Nag1/2 und ACT1 mit (+) und ohne (-) Induktion durch GlcNAc.	37
Abbildung 3.4: Amplifikation der cDNA des EFG1-Gens nach Anzucht mit (+) und ohne (-). Induktion durch GlcNAc.	38
Abbildung 3.5: SSCP-Analyse der Nag1/3-PCR-Produkte für die atypischen <i>C. albicans</i> -Stämme.	40
Abbildung 3.6: SSCP-Muster ausgewählter atypischer und typischer <i>C. albicans</i> (Nag1/3-PCR-Produkt).	40
Abbildung 3.7: Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Stämmen ermittelt mit der Parsimony-Methode basierend auf den NAG1-DNA-Sequenzen.	44
Abbildung 3.8: Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Stämmen ermittelt mit der Neighbour-Joining-Methode basierend auf den NAG1-DNA-Sequenzen.	45
Abbildung 3.9: Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Stämmen ermittelt mit der Parsimony-Methode basierend auf den NAG1-Proteinsequenzen.	46
Abbildung 3.10: Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Stämmen ermittelt mit der Neighbour-Joining-Methode basierend auf den NAG1-Proteinsequenzen.	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Taxonomische Eingruppierung der Gattung <i>Candida</i> .	10
Tabelle 1.2: Die wichtigsten pathogenen <i>Candida</i> -Spezies und deren bisher bekannte sexuelle Formen.	10
Tabelle 1.3: Morphologische Eigenschaften ausgewählter pathogener <i>Candida</i> Spezies. (modifiziert nach Calderone, 2002b).	13
Tabelle 2.1: Atypische <i>C. albicans</i> -Stämme aus Afrika.	24
Tabelle 2.2: Typische <i>C. albicans</i> -Stämme.	24
Tabelle 2.3: Primer für verschiedene PCRs.	28
Tabelle 2.4: Gene und deren Amplifikations-Primer.	28
Tabelle 2.5: PCR-Ansatz.	29
Tabelle 2.6: PCR-Programme für die Primerpaare Nag1/Nag2, Nag 2/4, Nag1/3, EF1-3/EF1-5, EFG1/RT-1/ EFG1/RT-2.	29
Tabelle 2.7: PCR-Programm für das Primerpaar ACT1-F/ACT1-R.	30
Tabelle 2.8: DNase-Behandlung (Vorbereitung für die RT).	31
Tabelle 2.9: Durchführung RT-PCR.	31
Tabelle 2.10: Reaktionsmaster-Mix für die Sequenzierung.	33
Tabelle 2.11: Terminations-Mix für die Sequenzierung.	33
Tabelle 2.12: Cycle Sequencing.	33
Tabelle 3.1: Vergleich der SSCP-Muster für die Genfragmente Nag1/2,1/3 und 2/4.	39
Tabelle 3.2: Mutationen im Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase-Gen.	42
Tabelle 3.3: GenBank Accession-Nummern für die sequenzierten <i>C. albicans</i> -Stämme.	43
Tabelle A.1: Sequenzvergleich des Nag1-Gens typischer und atypischer <i>C. albicans</i> Populationen.	63
Tabelle A.2: Vergleich der Proteinsequenzen des Nag1-Genes von typischen und atypischen <i>C. albicans</i> -Populationen.	69

Abkürzungsverzeichnis

AA	atypische Stämme aus Angola
ACT1	Aktin
AM	atypische Stämme aus Madagaskar
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Candida</i>
°C	Grad Celsius
CaNAG1	Glucosamin-6-Phosphat Desaminase-Gen
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn-Delft, Niederlande
cm	Zentimeter
cph1	Transkriptionsfaktor CPH1
CTAB	Hexadecetyltrimethylammoniumbromid
DDT	Dichlordiphenyltrichloräthen
DAC	N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	durch RT von mRNA gewonnene DNA
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EF1	Elongationsfaktor
EFG1/Efg1	Transkriptionsfaktor
g	Gramm
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GNPDA	Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase
GT-Puffer	Glycerol-toleranter Puffer
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
MgAc	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAG1	Glucosamin-6-Phosphat Desaminase-Gen
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGI	Phosphoglucose Isomerase

pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphisms
ssp.	Subspezies
Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
z. B.	zum Beispiel