

3 Ergebnisse

3.1 Aktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase bei typischen und atypischen *C. albicans*-Stämmen

Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms GNPDA wurden die *C. albicans*-Stämme einmal in Gegenwart und einmal in Abwesenheit des Induktors N-Acetylglucosamin angezchtet. Insgesamt wurde bei 10 Stämmen die Enzymaktivität untersucht. Dafür wurden vier beliebige typische Stämme, der atypische Stamm AM 1649 aus Madagaskar, der sich von den übrigen atypischen Stämmen in der DNA-Sequenz und dem SSCP-Muster unterscheidet, sowie zwei weitere atypische Stämme aus Madagaskar und drei atypische Stämme aus Angola ausgewählt. In Abbildung 3.1 sind die Werte der ersten Bestimmung für jeden Stamm dargestellt. Die Werte wurden in einem Wiederholungsexperiment reproduziert.

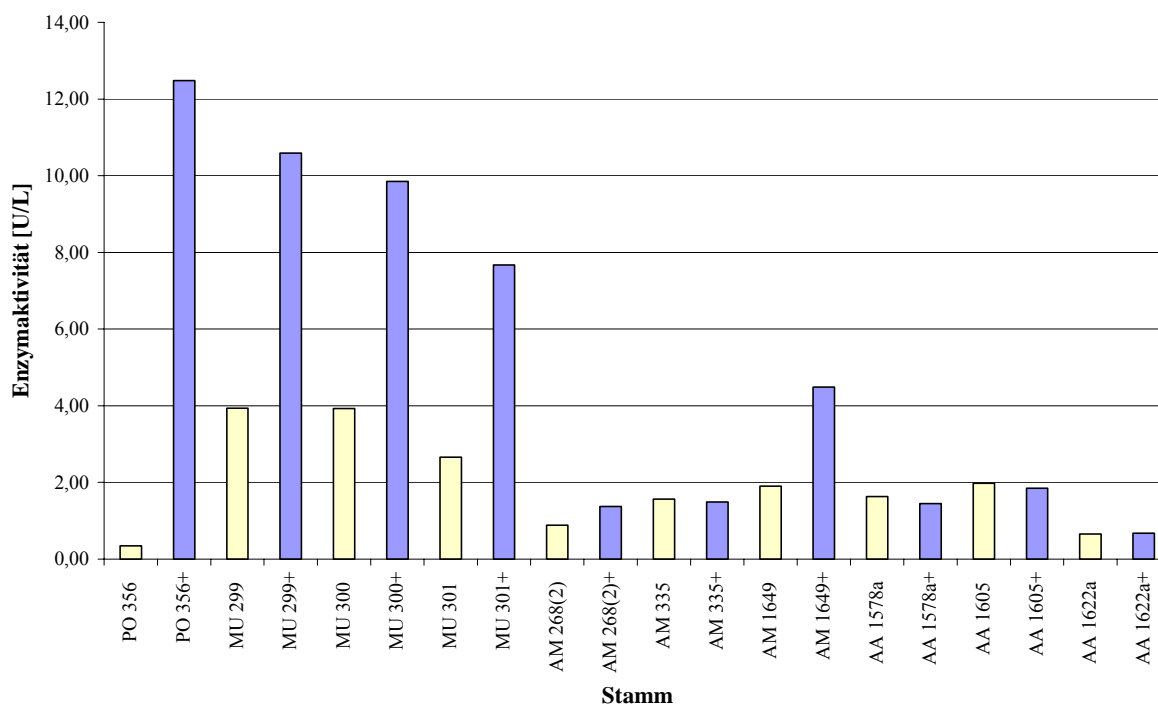


Abbildung 3.1:

Enzymaktivität der GNPDA mit (+) und ohne Induktion durch GlcNAc

Eine Grundaktivität des nicht induzierten Enzyms ließ sich sowohl bei den typischen als auch bei den atypischen Stämmen aus Angola und Madagaskar bestimmen. Bei einer optischen Zelldichte von $OD_{600} = 5$ wurden Aktivitäten zwischen 0,5–4 U/l erhalten. Drei der typischen *C. albicans*-Stämme (MU 299, MU 300, MU 301) wiesen mit Werten zwischen 2,5 und 4 U/l höhere Grundaktivitäten als alle atypischen Stämme und der typische Stamm MU 356 auf. Die Induktion mit

GlcNAc verursachte bei den typischen Stämmen eine Erhöhung der Enzymaktivität um das drei- bis fünffache, während bei den atypischen Stämmen (AM 268(2), AM 335, AA 1578, AA 1605 und AA 1622a) kein Anstieg der Enzymaktivität beobachtet werden konnte. Bei dem atypischen Stamm AM 1649 kam es lediglich zu einer Verdoppelung der Aktivität von 2 auf 4 U/l.

3.2 Analyse der NAG1-Expression in typischen und atypischen *C. albicans*-Stämmen

Die Anzucht der *Candida albicans*-Stämme zur Analyse der NAG1-Expression erfolgte in YNB-Mangelnährmedium mit und ohne Zusatz von GlcNAc, um zu untersuchen, ob die mRNA-Transkription durch GlcNAc gesteigert werden konnte. Als interne RNA-Kontrolle und zur Detektion genomischer DNA wurde ein 891 bp großes Fragment des EFB1-Gens (Elongationsfaktor) amplifiziert, welches ein 365 bp großes Intron enthielt [Maneu et al., 1996; Schaller et al., 1999]. Die Anwesenheit des Introns erlaubte bei der Auftrennung im Gel eine Differenzierung zwischen genomischer und cDNA (siehe Abbildung 3.2). In den Spuren 2–15 sind die in cDNA umgewandelten RNAs zu erkennen und in der Spur 17 das als Gegenkontrolle aufgetragene Amplifikationsprodukt aus genomischer DNA.

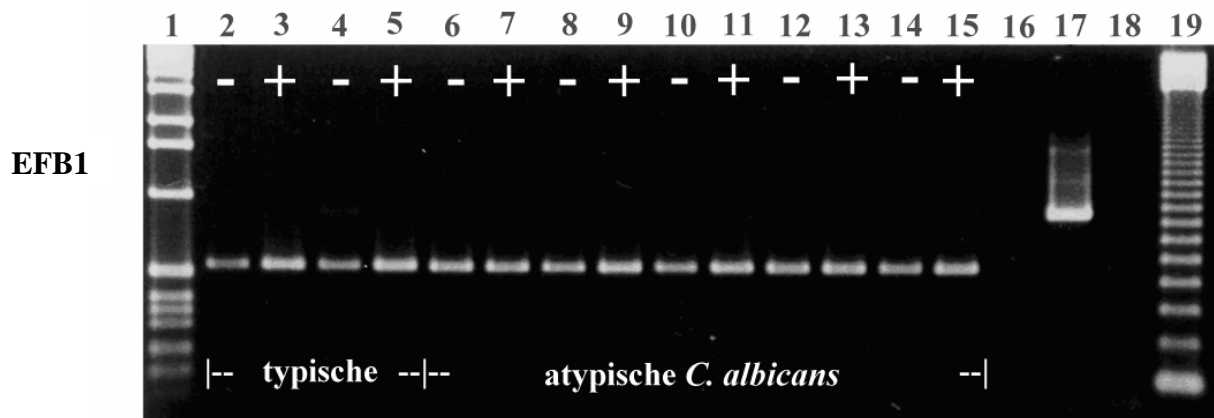


Abbildung 3.2:

Expression des Genes EFB1, mit (+) und ohne (-) Induktion durch GlcNAc. Spur 1 und 19 Leiter (Größenmarker); Negativkontrolle: Spur 16 und 18; Spur 17 Positivkontrolle genomische DNA. Spur 2–3: MU 290; Spur 4–5: MU 288; Spur 6–7: AM 11; Spur 8–9: AM 82; Spur 10–11: AM 335; Spur 12–13: AM 1649; Spur 14–15: AA 1622a.

Die cDNA des NAG1 ist in der Abbildung 3.3-Nag1/2 zu erkennen. Bei allen Stämmen ließen sich die in cDNA umgewandelte mRNA von NAG1 nachweisen. Um Differenzen aufgrund des Einsatzes von unterschiedlichen RNA- bzw. cDNA-Mengen ausschließen zu können, wurden die für das NAG1 gefundenen Amplifikate mit den entsprechenden für Aktin (ACT1) verglichen. Nur so konnte eine Aussage über eine gesteigerte Expression für NAG1 mit und ohne Induktion gemacht werden.

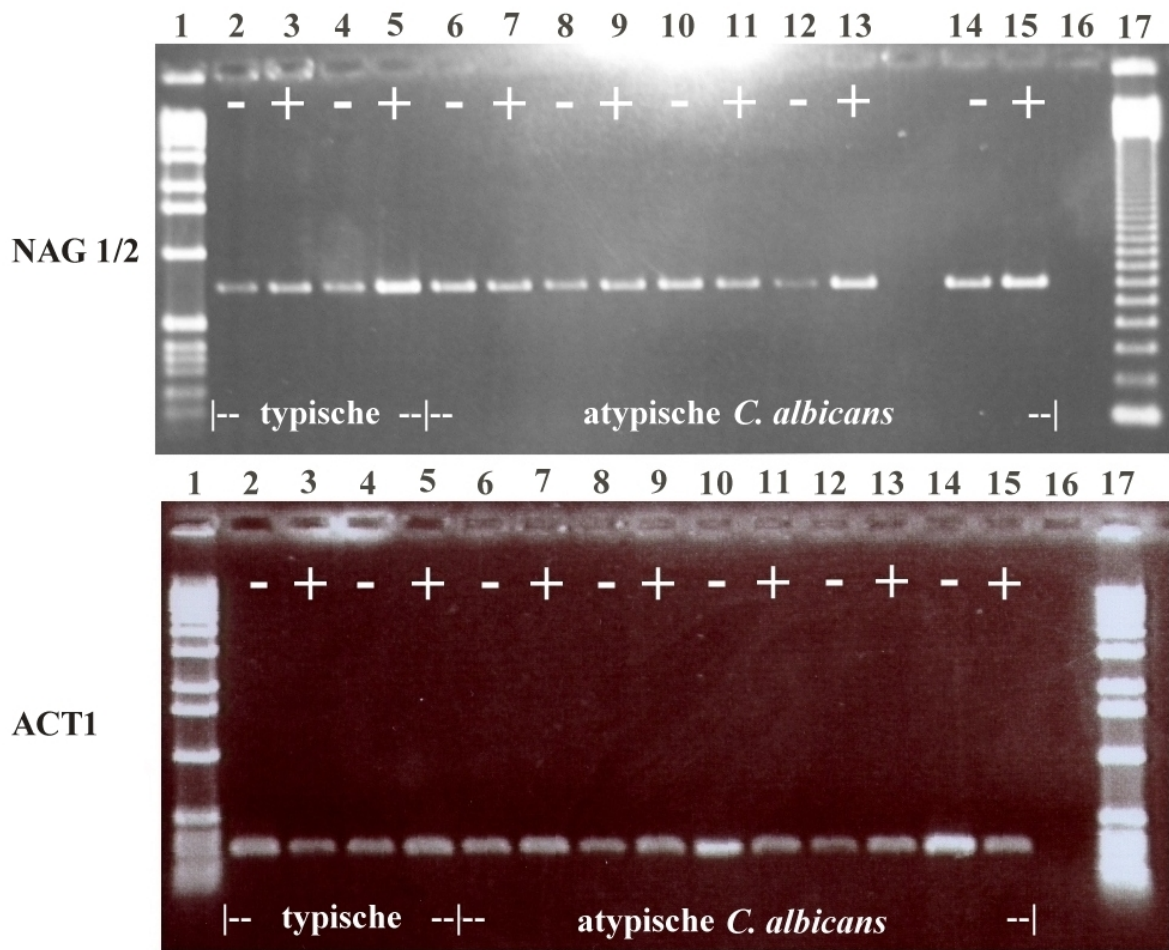


Abbildung 3.3

Expression der Gene Nag1/2 und ACT1 mit (+) und ohne (-) Induktion durch GlcNAc. Spur 1 und letzte Spur Leiter (Größenmarker); Negativkontrolle: Spur 16. Spur 2–3: MU 290; Spur 4–5: MU 288; Spur 6–7: AM 11; Spur 8–9: AM 82; Spur 10–11: AM 335; Spur 12–13: AM 1649; Spur 14–15: AA 1622a.

Vergleicht man die Banden der NAG1- und ACT1-cDNA der Spuren 2 und 3 (typischer Stamm MU 290), so ist bei dem ACT1-Gen die cDNA-Bande bei der nicht-induzierten Anzucht stärker als bei der induzierten. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Banden beim NAG1, so ist hier die induzierte Bande stärker, was eine Zunahme der Expression des NAG1 vermuten lässt. Bei dem typischen Stamm MU 288 (Spur 4–5) und den atypischen Stämmen (AM 11, AM 82, AM 335) ist, abgesehen vom Stamm AM 1649 (Spur 12–13) und AA 1622a (Spur 14–15), kein Unterschied zwischen den induzierten und nicht induzierten Proben festzustellen. Insgesamt lässt sich keine eindeutige Aussage über die Induzierbarkeit der Expression des NAG1 durch GlcNAc der *C. albicans*-Stämme treffen.

Das Amplifikat des Gens EFG1 wird in Abbildung 3.4 dargestellt. Bei allen untersuchten Stämmen ließ sich das Transkript der mRNA nachweisen. Weder bei den typischen noch bei den

atypischen *C. albicans*-Stämmen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen induzierter und nicht-induzierter Anzucht erkennen. Die Expression des EFG1-Gens schien bei den atypischen Stämmen stärker zu sein als bei den typischen.

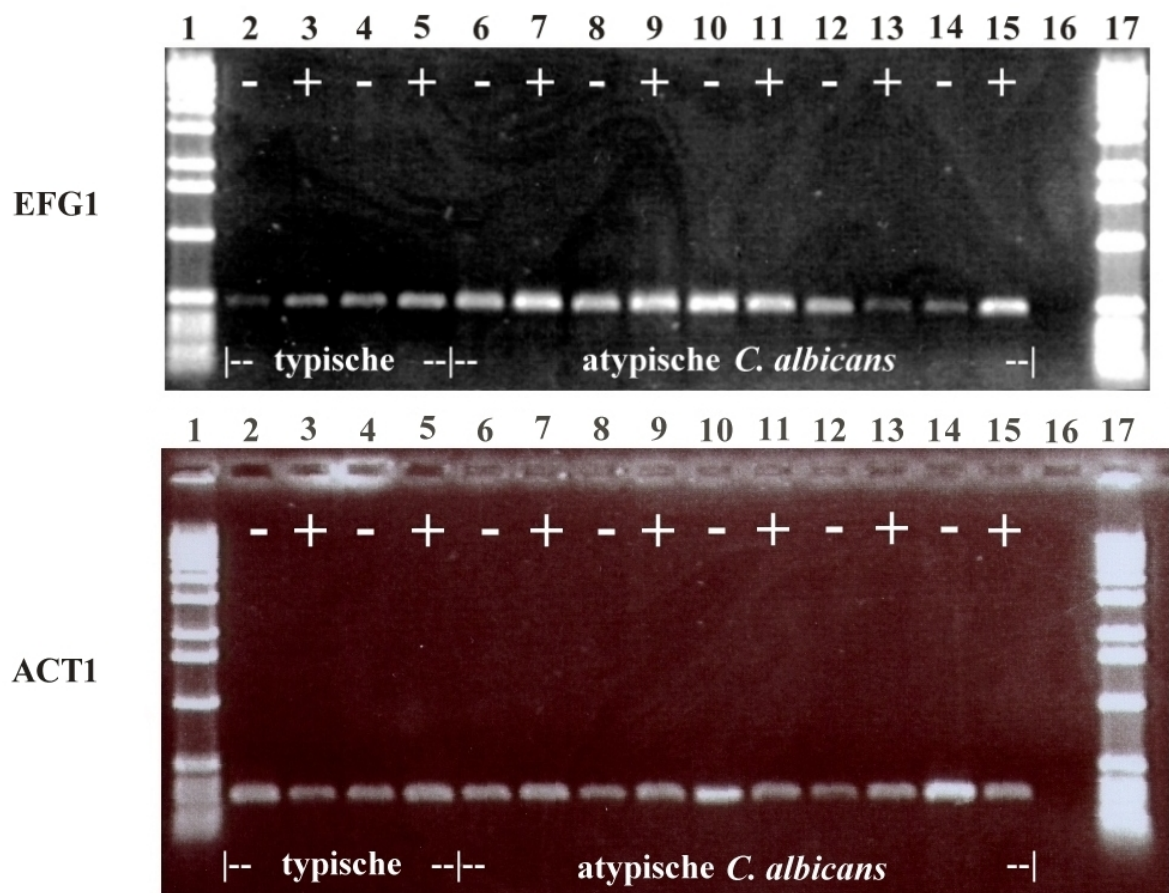


Abbildung 3.4:

Amplifikation der cDNA des EFG1-Gens nach Anzucht mit (+) und ohne (-) Induktion durch GlcNAc. Negativkontrolle: Spur 16. Spur 2–3: MU 290; Spur 4–5: MU 288; Spur 6–7: AM 11; Spur 8–9: AM 82; 10–11: AM 335; Spur 12–13: AM 1649; Spur 14–15: AA 1622a.

3.3 Sequenzanalyse des NAG1 für *C. albicans*-Stämme mit normalem und atypischem Biotyp

3.3.1 SSCP-Analysen

Für ein Screening nach Polymorphismen wurden zunächst Genabschnitte des NAG1 mit Hilfe der Primerpaare Nag1/2, Nag1/3 und Nag2/4 amplifiziert und anschließend auf SSCP-Polymorphismen (siehe Abschnitt 2.10) untersucht. Das Primerpaar Nag1/2 amplifiziert die gesamte kodierende Region (bp 3–739), während das Paar Nag1/3 die erste Hälfte der Sequenz (bp 3–378) und Nag2/4 die zweite (bp 358–739) amplifiziert. Insgesamt wurden SSCP-Muster

von 39 Stämmen, darunter 27 atypische *C. albicans* (siehe Abschnitt 2.2, Tabelle 2.1 und linke Spalte von Tabelle 2.2 analysiert.

Tabelle 3.1:

Vergleich der SSCP-Muster für die Genfragmente Nag1/2, 1/3 und 2/4.

Stämme	Nag1/2	Nag1/3	Nag2/4	Stämme	Nag1/2	Nag1/3	Nag2/4
CBS 562	A	A	A	AA 1598a	D	D	D
CBS 5983	B	B	B	AA 1598b	D	D	D
CBS 1905	C	C	C	AA 1605	D	D	D
AM 2	D	D	D	AA 1618	D	D	D
AM 11	D	D	D	AA 1622a	D	D	D
AM 82	D	D	D	AA 1622b	E	E	E
AM 268(2)	D	D	D	AA 1626	D	D	D
AM 335	D	D	D	AA 1634	D	D	D
AM 1649	E	E	E	AA 579	D	D	D
AM 1653	D	D	D	AA 795	D	D	D
AM 1654	D	D	D	BP 8	F	B	F
AM 1655	D	D	D	BP 17	G	F	B
AM 1660	D	D	D	BP 24	H	G	G
AM 1669	D	D	D	BP 41	I	H	H
AM 8621	D	D	D	BP 31	J	I	I
AM 8627	D	D	D	BE 114	L	J	J
AM 8640	D	D	D	TA 90	M	-	K
AA 1078/96	D	D	D	TA 73	-	I	K
AA 1578a	D	D	D	MU 305	K	G	L
AA 1578b	D	D	D				

Es zeigte sich bei allen Genfragmenten, dass 25 der 27 atypischen *C. albicans*-Stämmen ein einheitliches SSCP-Muster aufwiesen (Abbildung 3.5). Bei den beiden Stämmen, die sich von den anderen atypischen Stämmen unterschieden, handelte es sich um einen Stamm aus Madagaskar (AM 1649) und einen aus Angola (AA 1622b). Diese zeigten wiederum ein untereinander vergleichbares Muster. Im Gegensatz dazu waren die Referenzstämme und die Isolate der Normalpopulation durch eine große Variabilität der SSCP-Muster charakterisiert (Abbildung 3.6). Die Ergebnisse der SSCP-Analysen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Für die Bezeichnung der verschiedenen Bandenmuster A bis M erhielt jedes neu auftretendes Bandenmuster einen neuen Buchstaben, d.h. identische Muster wurden mit identischen Buchstaben gekennzeichnet. Für jedes PCR-Produkt (Nag 1/2, Nag 1/3 und 2/4) wurde die Zuordnung der Buchstaben neu begonnen.

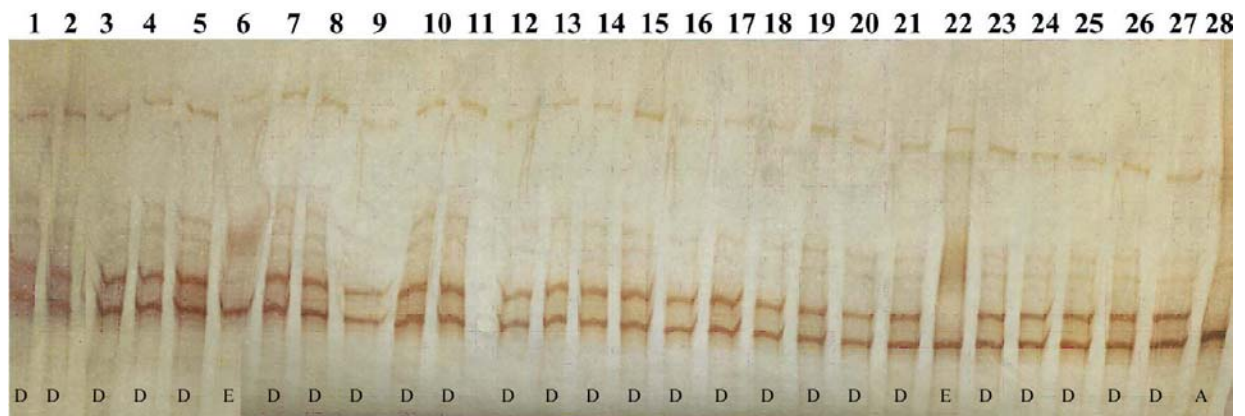


Abbildung 3.5:

SSCP-Analyse der Nag1/3-PCR-Produkte für die atypischen *C. albicans*-Stämme. Spur 1: AM 2; Spur 2: AM 11; Spur 3: AM 82; Spur 4: AM 268(2); Spur 5: AM 335; Spur 6: AM 1649; Spur 7: AM 1653; Spur 8: AM 1654; Spur 9: AM 1655; Spur 10: AM 1660 ; Spur 11: AM 1669; Spur 12: AM 8621; Spur 13: AM 8627; Spur 14: AM 8640; Spur 15: AA 1578a; Spur 16: AA 1578b; Spur 17: AA 1598a; Spur 18: AA 1598b; Spur 19: AA 1605; Spur 20: AA 1618; Spur 21: AA 1622a; Spur 22: AA 1622b; Spur 23: AA 1626; Spur 24: AA 1634; 25: AA 1078/96; Spur 26: AA 579; Spur 27: AA 795; Spur 28: CBS 562. Die Bandenmuster der Isolate in Spur 6 (AM 1649) und Spur 22 (AA 1622b) unterschieden sich von denen der übrigen atypischen Isolaten. In Spur 28 (CBS 562) ist der Referenzstamm aufgetragen.

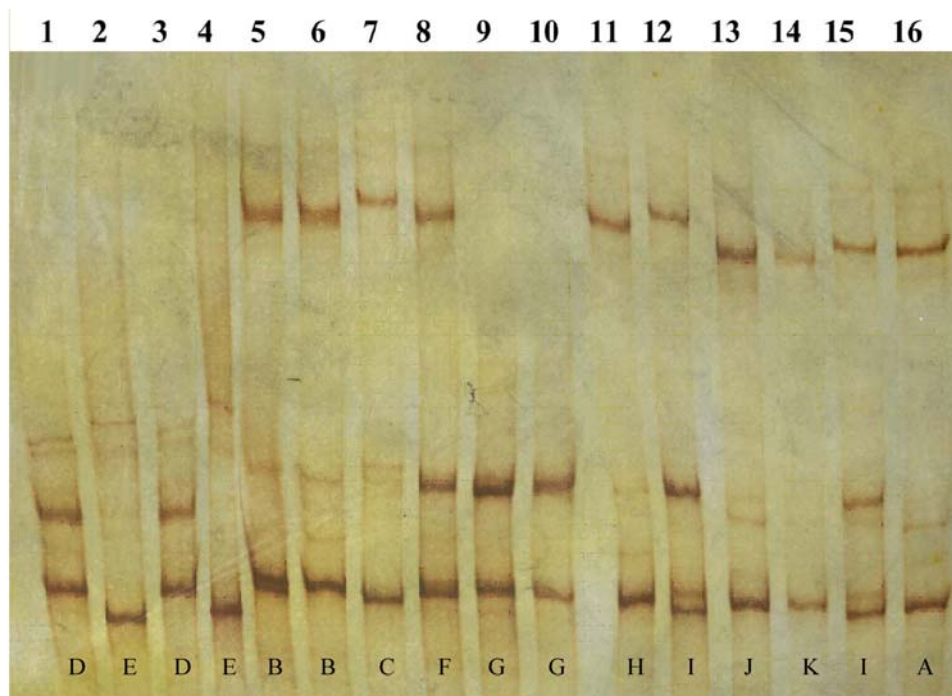


Abbildung 3.6:

SSCP-Muster ausgewählter atypischer und typischer *C. albicans* (Nag1/3-PCR-Produkt). Spur 1: AM 335; Spur 2: AM 1649; Spur 3: AA 1622a; Spur 4: AA 1622b; Spur 5: BP 8; Spur 6: CBS 5983; Spur 7: CBS 1905; Spur 8: BP 17; Spur 9: BP 41; Spur 10: MU 305; Spur 11: BP 73; Spur 12: BP 31; Spur 13: BE 114; Spur 14: TA 90; Spur 15: TA 73; Spur 16: CBS 562. In Spur 1–4 sind atypische *C. albicans*, die zwei verschiedene Bandenmuster repräsentieren, und in den Spuren 5, 8–16 die typischen *C. albicans* aufgetragen. In den Spuren 6, 7, 16 sind die Muster für Referenzstämme zu sehen, die eine hohe Variabilität aufweisen.

Insgesamt wurden dreizehn verschiedene SSCP-Muster für die Nag1/2- und Nag1/3-PCR-Produkte erhalten, wobei bei den atypischen Isolaten nur zwei verschiedene Bandenmuster auftraten. Für das Nag2/4-PCR-Produkt wurden zwölf verschiedene SSCP-Muster gefunden, wobei bei den atypischen *C. albicans* wiederum nur zwei unterschiedliche Bandenmuster vorkamen. Jeweils zwei typische Stämme zeigten bei den PCR-Produkten Nag1/3 und Nag2/4 ein identisches Muster. Beim Nag1/3-Amplifikat handelte es sich um den Referenzstamm CBS 5983 und den Stamm BP 8, beim Nag2/4-Produkt ebenfalls um den Referenzstamm CBS 5983 und der Stamm BP 17. Im Gesamtfragment (Primerpaar Nag1/2) gab es zwischen den einzelnen typischen Stämmen kein übereinstimmendes SSCP-Muster (siehe Tabelle 3.1). Keines der SSCP-Muster der typischen *C. albicans*-Stämme stimmte mit einem der atypischen überein.

3.3.2 DNA-Sequenzanalysen

Mit der Sequenzierung der PCR-Produkte Nag1/3 (bp 3–378) und Nag2/4 (bp 358–Ende) wurde der gesamte Leserahmen für das NAG1 erfasst. Das Alignment der DNA- und Proteinsequenzen wurde mit der von Natarajan und Datta (1993) für den Stamm SC5314 publizierten Sequenz des NAG1 (GenBank Accession-Nr: L07558) verglichen. Die beschriebenen Veränderungen in der DNA-Sequenz bezogen sich auf diese Sequenz. Durch die Übersetzung der DNA in die Proteinsequenz wurde es möglich, die Auswirkung der Mutationen auf die Aminosäuresequenz zu beurteilen. In den 35 sequenzierten Stämmen (12 typische und 23 atypische) wurden insgesamt 21 Punkt-Mutationen (Positionen 76, 82, 115, 181, 193, 215, 221, 271, 335, 337, 397, 403, 434, 445, 450, 454, 457, 487, 556, 568, 612) gefunden, wobei die atypischen *C. albicans*-Stämme ein im Vergleich zu den typischen *C. albicans* homogeneres Bild zeigten (siehe Tabelle 3.2). Alle Mutationen sind in der Tabelle 3.2 zusammengestellt.

Die Basenaustausche an den Positionen 76 (AAC-AAT), 82 (ACC-ACT), 403 (TTA-TTG/R¹) und 454 (TCA-TAT) traten sowohl bei den atypischen als auch bei den typischen Stämmen auf und hatten keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge. An der Position 191 (ACC-ACT) befand sich eine Mutation, die alle atypischen Stämme, mit Ausnahme von AM 1649 und AA 1622b betraf, aber nicht mit einem Aminosäureaustausch einherging. Neutrale Nukleotidaustausche an den Positionen 115 (GGG-GGA/R¹), 181 (AAA-AAG/R¹), 337 (GAG-GAA), 397 (GGT-GGC), 445 (TCA-TCG), 457 (AAA-AAG/R¹), 487 (ACC-ACT), 556 (GGT-GGC/Y²) und 568 (ATC-ATA) wurden nur bei typischen *C. albicans* beobachtet.

¹ R = G/A

² Y = C/T

Tabelle 3.2:

Mutationen im Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase-Gen

Position	76	82	87	90	335/337	397	403	434	445	448	449	454	151	457	152	487	162	556	158	568	189	612	204
		AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS
SC5314	AAC	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTA	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
CBS 562	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAG	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
CBS 5983	AAC	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTA	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
CBS 1905	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 2	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 11	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 82	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 268(2)	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 335	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 1649	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 1653	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 1654	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 1660	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 1669	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 8621	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 8627	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AM 8640	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1578a	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1578b	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1598a	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1598b	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1618	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1622b	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1626	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 1634	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 579	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
AA 795	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
BP 8	AAC	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTA	L GCG	A TCG	S TCA	S AGC	S TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S					
BP 17	AAC	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGY	G ATC	I AGT	S						
BP 41	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGC	G ATC	I AGT	S						
BP 24	AAC	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTA	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAA	K ACC	T GGT	G ATC	I AGT	S						
BP 31	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAG	K ACC	T GGC	G ATC	I AGT	S						
370/97	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAG	K ACC	T GGC	G ATC	I AGT	S						
BE 114	AAC	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAG	K ACC	T GGC	G ATC	I AGT	S						
TA 90	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAG	K ACC	T GGC	G ATC	I AGT	S						
MU 305	AAT	N ACC	T GGG	G TTT	F GAG	E GGC	G TTG	L GCG	A TCA	S AAC	N TCA	S AAG	K ACC	T GGC	G ATC	I AGT	S						

L-Alanin (Ala; A); L-Arginin (Arg; R); L-Asparagin (Asp; G); L-Cystein (Cys; C); L-Glutamin (Gln; Q); L-Glutaminsäure (Glu; E); Glycin (Gly; G); L-Histidin (His; H); L-Isoleucin (Ile; I); L-Leucin (Leu; L); L-Lysin (Lys; K); L-Methionin (Met); M; L-Phenylalanin (Phe; F); L-Prolin (Pro; P); L-Serin (Ser; S); L-Threonin (Thr; T); L-Tryptophan (Trp; W); L-Tyrosin (Tyr; Y); L-Valin (Val; V)

Insgesamt ließen sich 7 Sense-Mutationen an den Positionen 215, 220, 271, 335, 434, 450, 612 nachweisen. Bei der Mutation an Position 220 (TTT-TTG) war Thymin durch Guanin ausgetauscht, wodurch die heterozyklische Aminosäure Phenylalanin (Phe; F) durch die neutrale Aminosäure Leucin (Leu; L) ersetzt wurde. Von dieser Mutation waren alle atypischen und 9 typische Stämme betroffen. Bei zwei atypischen Stämmen, AA 1622b und AM 1649, bedingte eine Mutation an der Position 215 (GGA-AGA) den Einbau der basischen Aminosäure Arginin (Arg; R) anstelle der neutralen Aminosäure Glycin (Gly; G) ins Protein. Die Mutationen an den Positionen 335 (GAG-AAG) und 434 (GCG-ACG) traten bei allen atypischen *C. albicans*, mit Ausnahme der beiden Stämme AM 1649 und AA 1622b, auf. An Position 335 (GAG-AAG) hatte dies den Ersatz der sauren Aminosäure Glutaminsäure (Glu; E) durch die basische Aminosäure Lysin (Lys; K) zur Folge. Die Punktmutation an Position 434 ersetzte die erste Base des Triplets GAG (Guanosin) durch Adenosin, wodurch die neutrale Aminosäure Alanin (Ala, A) durch Threonin (Thr, T) ausgetauscht wurde. Weitere Mutationen mit Änderung der Aminosäuresequenz betrafen nur typische *C. albicans*-Stämme. Position 271 (TTC-TTG) hatte wie bei Position 220 einen Austausch von Phenylalanin (Phe; F) zu Leucin (Leu; L) zur Folge und betraf die Stämme BE 114, TA 90 und MU 305. Durch eine Mutation an Stelle 450 (AAC-AGC) wurde die neutrale Aminosäure Asparagin (Asn; N) beim Stamm BP 8 durch die ebenfalls neutrale Aminosäure Serin (Ser; S) ersetzt. Ein umgekehrter Austausch fand bei Stamm MU 305 an Position 612 (AGT-AAT) statt, d. h. Serin wurde durch Asparagin ersetzt.

Tabelle 3.3:

Accession-Nummern der GenBank für die sequenzierten *C. albicans*-Stämme.

Stammbezeichnung	Accession-Nr.	Stammbezeichnung	Accession-Nr.
CBS 562	AY936133	AA 1598a	AY936151
CBS 5983	AY936134	AA 1598b	AY936152
CBS 1905	AY936135	AA 1618	AY936153
AM 2	AY936136	AA 1622b	AY936154
AM 11	AY936137	AA 1626	AY936155
AM 82	AY936138	AA 1634	AY936156
AM 268(2)	AY936139	AA 579	AY936157
AM 335	AY936140	AA 795	AY936158
AM 1649	AY936141	BP 8	AY936159
AM 1653	AY936142	BP 17	AY936160
AM 1654	AY936143	BP 41	AY936161
AM 1660	AY936144	BP 24	AY936162
AM 1669	AY936145	BP 31	AY936163
AM 8621	AY936146	MU 229	AY936164
AM 8627	AY936147	BE 114	AY936165
AM 8640	AY936148	TA 90	AY936166
AA 1587a	AY936149	MU 305	AY936167
AA 1587b	AY936150		

3.3.3 Stammvergleiche zwischen typischen und atypischen *C. albicans*

Um festzustellen, wie weit die beiden *C. albicans*-Populationen voneinander abweichen, wurde eine phylogenetische Analyse mit der DNA- und den Proteinsequenzen des NAG1 durchgeführt.

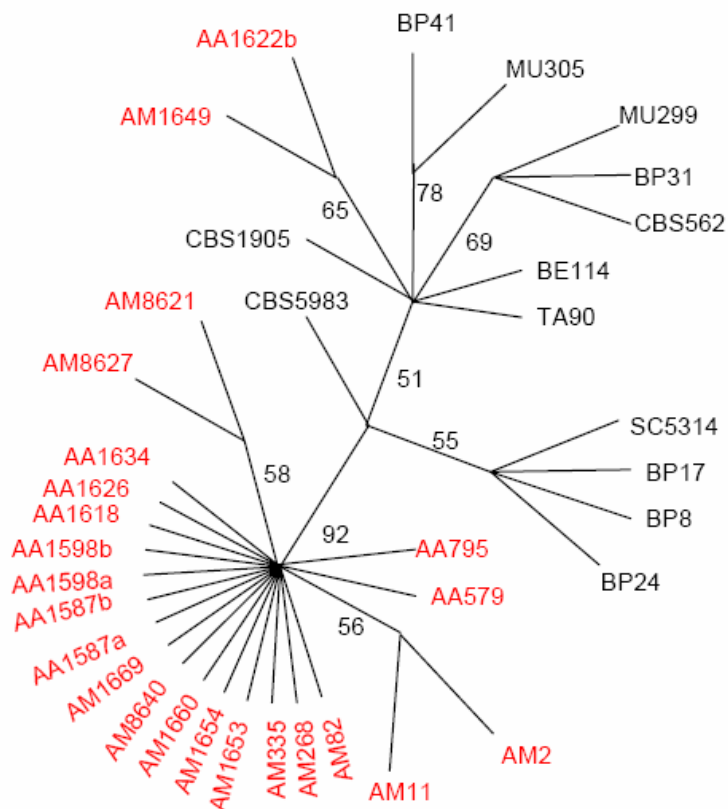


Abbildung 3.7:

Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen (rot) *C. albicans*-Stämmen, ermittelt mit der Parsimony-Methode basierend auf den NAG1-DNA-Sequenzen.

In den Alignments der DNA-Sequenzen der typischen und atypischen Stämme waren 709 der 738 Charaktere konstant und 29 variabel. Davon waren 18 Parsimony-informativ und 11 nichtinformativ. Insgesamt wurden 39 Bäume gefunden, alle Bäume sind *unrooted* in einem Konsensus-Baum dargestellt (siehe Abbildung 3.7). Die atypischen Stämme bilden ein statistisch gut abgesichertes Cluster (92 %), mit Ausnahme der Stämme AM 1649 und AA 1622b. Die anderen Stämme sind sehr variabel, die gefundenen Gruppen sind statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse mit der Parsimony- und Neighbour-Joining-Methode sind weitgehend übereinstimmend, im Neighbour-Joining-Baum (Abbildung 3.8) bilden AM 1649 und AA 1622b eine relativ gut gesicherte Gruppe mit CBS 1905.

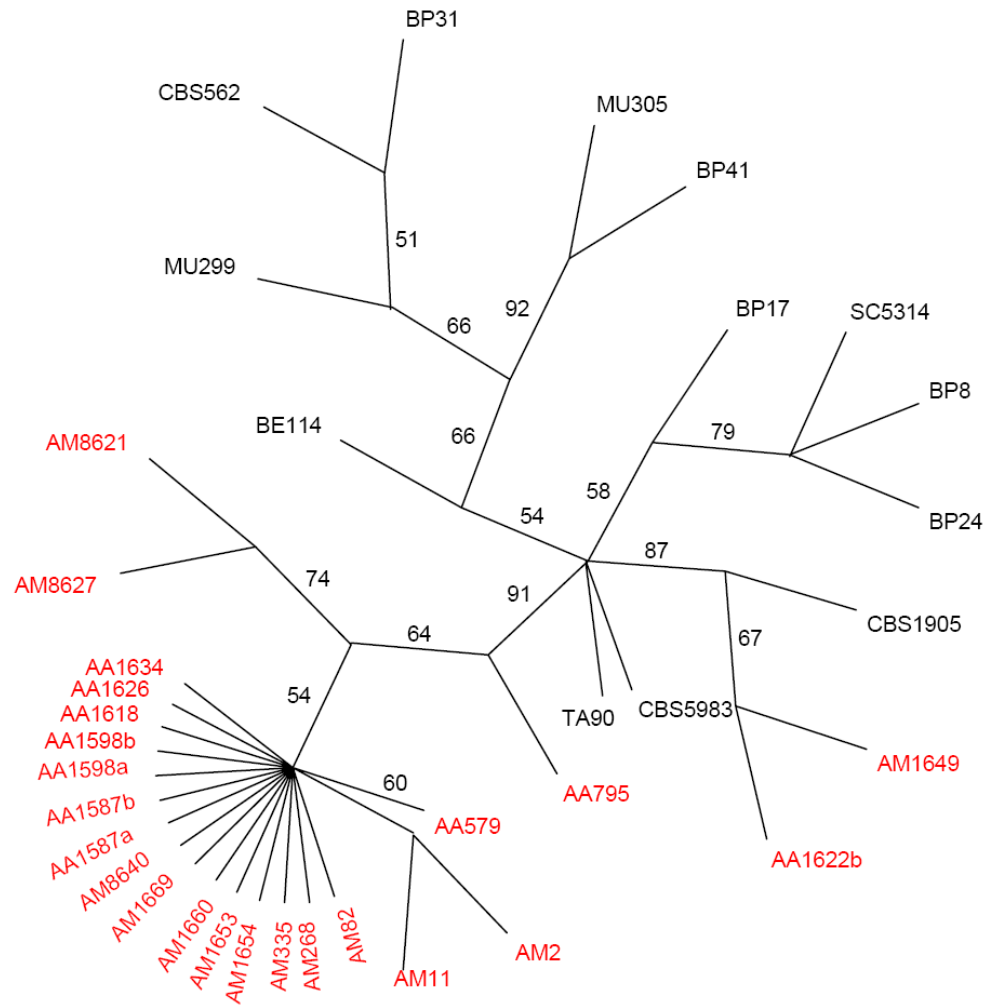


Abbildung 3.8:

Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen (rot) *C. albicans*-Stämmen, ermittelt mit der Neighbour-Joining-Methode basierend auf den NAG1-DNA-Sequenzen.

Die Analyse der Proteinsequenz zeigt, dass 233 der 245 Charaktere konstant waren und 12 variabel, davon waren 7 Parsimony-informativ und 5 nichtinformativ. Es wurden 13 Bäume gefunden, die in einem *unrooted* Konsensus-Baum (Abbildung 3.9) dargestellt wurden. Die Ergebnisse ähneln den DNA-Ergebnissen, nur die statistische Absicherung des atypischen Clusters ist mit 60 % geringer, und AM 1649 und AA 1622b bilden eine eigenständige Gruppe. Auch hier ähneln sich die Ergebnisse beider Methoden (Parsimony-Methode siehe Abbildung 3.9 und Neighbour-Joining-Methode siehe Abbildung 3.10), jedoch ist die statistische Absicherung der Neighbour-Joining-Methode geringer als bei der Parsimony-Methode.

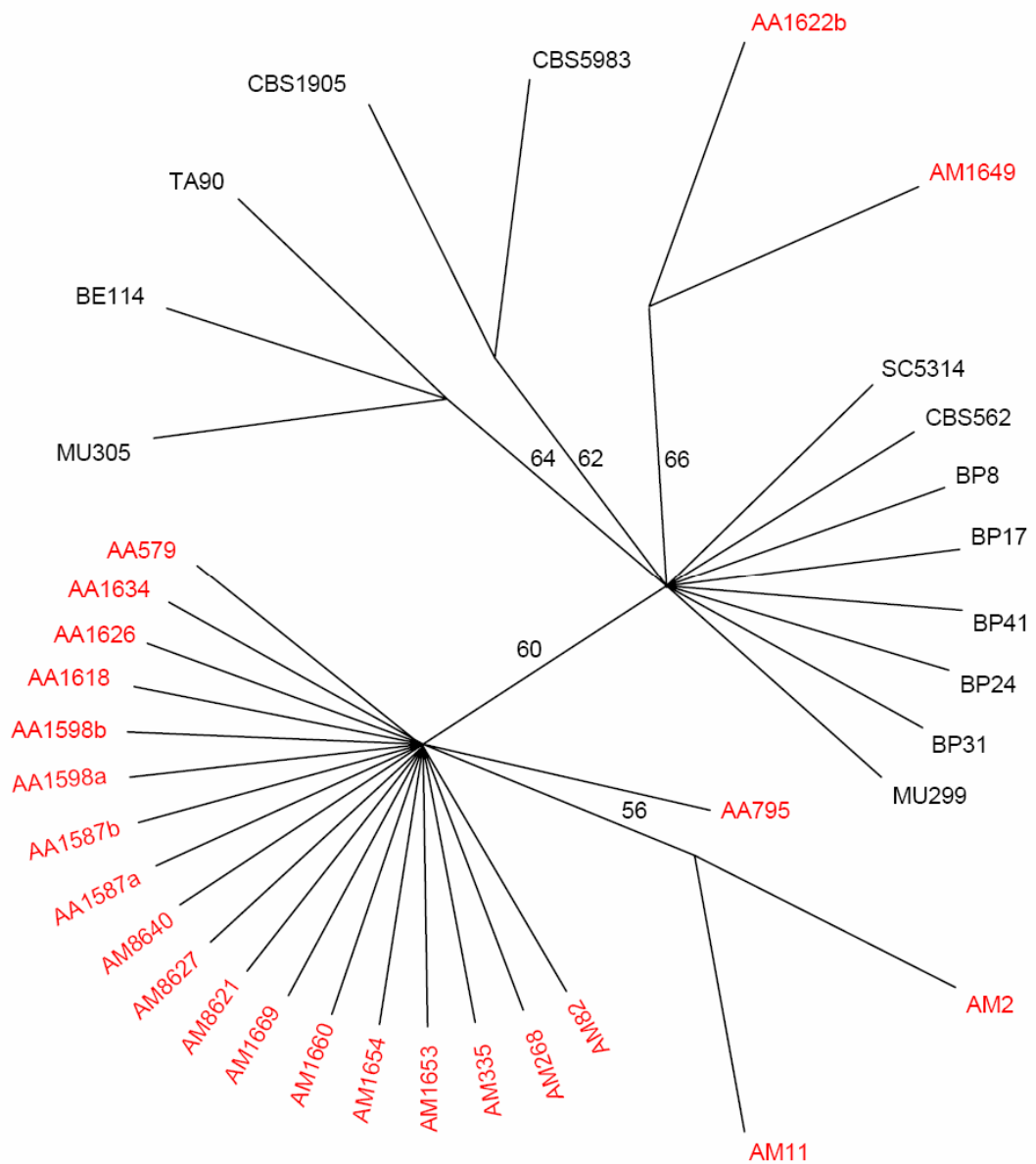


Abbildung 3.9:

Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen (rot) *C. albicans*-Stämmen, ermittelt mit der Parsimony-Methode basierend auf den NAG1-Proteinsequenzen.

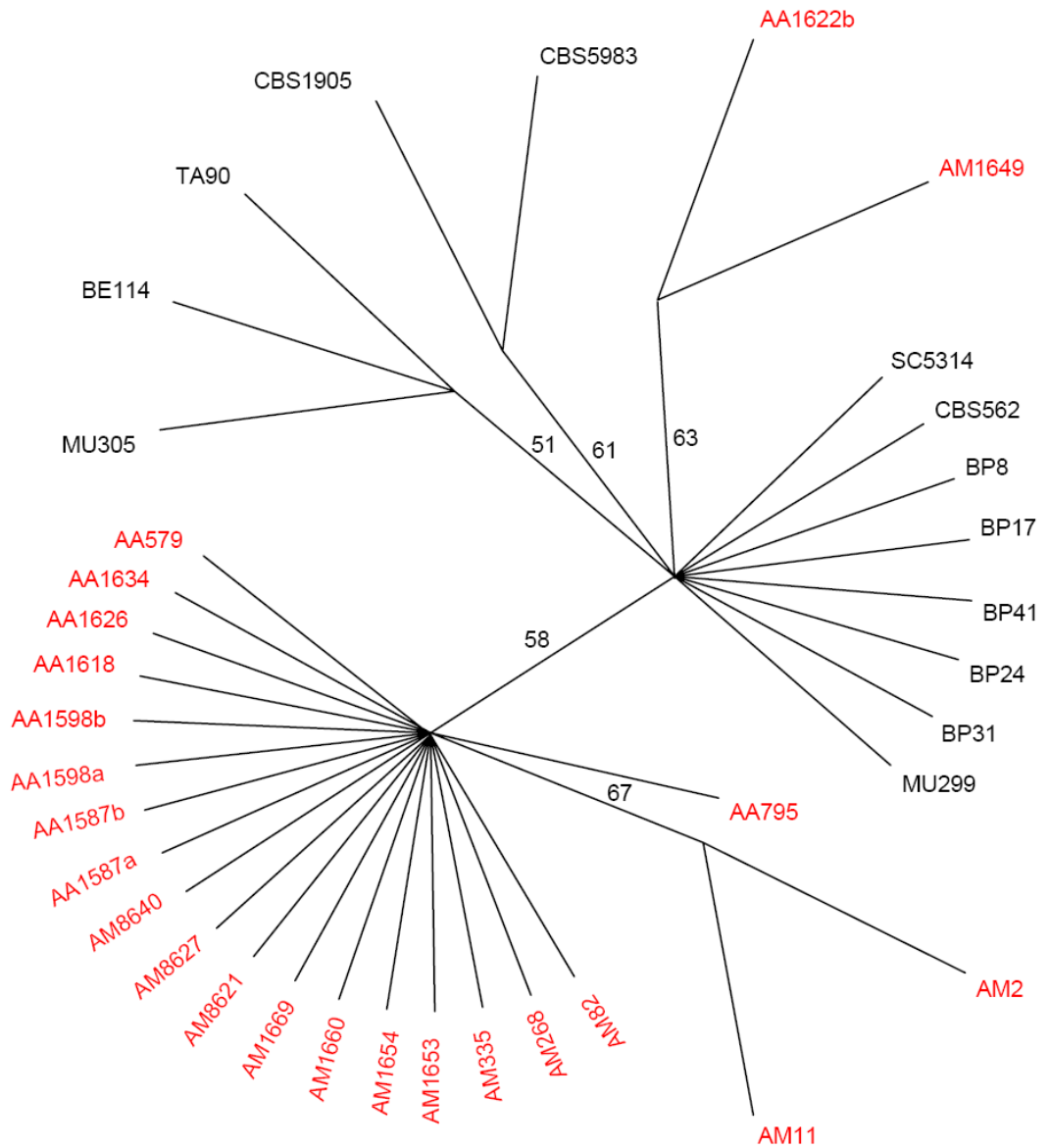


Abbildung 3.10:

Phylogenetische Beziehungen zwischen den typischen und atypischen (rot) *C. albicans*-Stämmen ermittelt mit der Neighbour-Joining-Methode basierend auf den NAG1-Proteinsequenzen.