

## 4 Diskussion

Vertreter der Gattung *Candida* werden immer häufiger als Verursacher nosokomialer Infektionen diagnostiziert. In diesem Zusammenhang treten oft *C. albicans*-Stämme auf, die vom üblichen Phänotyp und biochemischen Reaktionsmuster abweichen (siehe Tabellen 1.4 und 1.6). In dieser Arbeit wurde das Enzym Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA) von typischen und atypische *C. albicans* Stämmen untersucht. Die atypischen Stämme wurden von Tietz und Mitarbeitern [Tietz et al., 1995] aus Vaginalabstrichen afrikanischer Frauen isoliert. Diese Stämme sind nicht in der Lage, die Aminosucker GlcN und GlcNAc, das Disaccharid Trehalose und die organische Säure Laktat zu assimilieren. Das Wachstum der atypischen *C. albicans*-Stämme auf Sabouraud-Glucose-Agar sowie die Keimschlauchbildung in Serum ist verlangsamt und die Isolate bilden keine Chlamydosporen auf Reisagar [Tietz et al., 1995]. Im Jahr 2002 wurde eine Arbeit über ähnliche Stämme in Saudi-Arabien publiziert [Al-Hedaithy and Fotedar, 2002].

Bisher ist unklar, worauf die fehlende Verwertung der Aminosucker GlcNAc und GlcN bei den atypischen *C. albicans* zurückzuführen ist.

Bei *C. albicans* hat das Enzym GNPDA eine Schlüsselfunktion im Stoffwechsel der Aminosucker GlcN und GlcNAc. Mutationen in diesem Enzym können dazu führen, dass beide Substrate nicht mehr zu Fructose-6-Phosphat und Ammoniak umgesetzt werden können. Andererseits können Mutationen im Transportsystem für GlcNAc dazu führen, dass die GlcNAc-Spiegel in der Zelle nicht ausreichen, um die Transkription der mRNA für die Enzyme der Aminosucker-Assimilation, insbesondere der GNPDA, hoch zu regulieren. Als eine dritte Möglichkeit ist denkbar, dass der Promotor des GlcNAc-Regulons verändert ist und damit nicht mehr durch GlcNAc stimuliert werden kann. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich Unterschiede in der Enzymaktivität, der Expression des Enzyms und den DNA- und Proteinsequenzen bei typischen und atypischen *C. albicans*-Stämmen nachweisen lassen.

Die Aufnahme von GlcNAc in die Zelle erfolgt bei *C. albicans* durch ein konstitutives Transportsystem. Die Induktion der Enzyme des Regulons erfolgt durch das Substrat GlcNAc [Kumar et al., 2000; Natarajan and Datta, 1993], was zur Hochregulierung der abbauenden Enzyme und des spezifischen Transportsystems führt. In Abwesenheit von RNA- oder Proteinsynthese, d. h. wenn die mRNA- und Proteinsynthese blockiert werden, ist das Enzym GNPDA für mindestens 6 Stunden stabil. Andererseits fällt die induzierte Aktivität des Enzyms

nach Erschöpfung des GlcNAc innerhalb von 4 Stunden wieder auf die Grundaktivität ab [Singh and Datta, 1979a].

Die Aufnahme von GlcN erfolgt durch eine Zucker-Permease mit breiter Spezifität und wird durch die Induktion der Enzyme des GlcNAc-Gen-Clusters nicht beeinflusst. GlcN ist nicht in der Lage, die Enzyme des GlcNAc-Stoffwechsels und damit auch die GNPDA zu induzieren [Natarajan et al., 1984]. Die Tatsache, dass unterschiedliche Systeme für die Aufnahme der beiden Aminozucker verantwortlich sind, macht eine Störung dieser Transportsmechanismen als Ursache für die mangelnde Verwertung von GlcN und GlcNAc eher unwahrscheinlich. Außerdem müssten dann auch andere Stoffwechselwege betroffen sein.

Der Stoffwechselweg von GlcN und GlcNAc ist bei *C. albicans*, aber auch bei verschiedenen anderen Mikroorganismen, z. B. *E. coli*, ausführlich untersucht worden [Calcagno et al., 1984; Altamirano et al., 1992].

- GlcN wird durch die Glucosamin-Kinase phosphoryliert und durch die GNPDA zu Fructose-6-Phosphat und Ammoniak abgebaut.
- GlcNAc wird durch die N-Acetylglucosamin-Kinase zu N-Acetylglucosamin-6-Phosphat phosphoryliert, anschließend durch die N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase zu Glucosamin-6-Phosphat deacetyliert und durch GNPDA zu Fructose-6-Phosphat und Ammoniak umgewandelt.

Bei beiden Abbauwegen entsteht Fructose-6-Phosphat, welches eine zentrale Rolle im Stoffwechsel spielt und in viele verschiedene Stoffwechselwege mündet. Das Enzym GNPDA spielt somit eine wichtige Rolle im Metabolismus beider Aminozucker. Eine veränderte Aktivität dieses Enzyms könnte den veränderten Phänotyp der atypischen Stämme erklären.

#### **4.1 Enzymaktivität der Glucosamin-6-Phosphat-Desaminase (GNPDA)**

Die Bestimmung der GNPDA-Aktivitäten sollte zeigen, ob es einen Unterschied in der Induzierbarkeit der GNPDA bei den GlcNAc- und GlcN-negativen Stämmen im Vergleich zu den typischen Stämmen gibt. Die Anzucht der Stämme erfolgte in YNB-Nährmedien (mit und ohne GlcNAc) und es sollte geklärt werden, ob die Aktivität von GNPDA durch GlcNAc gesteigert werden kann. Während sich die Enzymaktivität bei den typischen *C. albicans*-Stämmen in Anwesenheit von GlcNAc auf das 3–5-fache und bei den atypischen *C. albicans*-Stämmen AA 1622b und AM 1649 auf das 2-fache der Grundaktivität erhöhte, wurde bei den

anderen atypischen Stämmen keine signifikante Aktivitätssteigerung gefunden. Bei Anzucht ohne GlcNAc hatten typische und atypische Stämme vergleichbare Grundaktivitäten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Defekt in diesem Enzymsystem dazu führt, dass die atypischen Stämme GlcNAc und GlcN nicht mehr bzw. schlechter verwerten können.

#### **4.2 Expression des NAG1-Gens in typischen und atypischen Stämmen**

Um zu ermitteln, ob die verminderte Enzymaktivierung in den atypischen Stämmen auf eine veränderte Expression des NAG1 zurückzuführen ist, wurde die Synthese der spezifischen mRNA in Kulturen mit und ohne Zusatz von GlcNAc untersucht. Die Bewertung der Ergebnisse ergab, dass im Gegensatz zur Enzymbestimmung die Unterschiede zwischen den induzierten und nicht induzierten Kulturen nicht deutlich waren. Es ließ sich mit dieser Methode auch kein signifikanter Unterschied in der Steigerung der RNA-Bildung bei atypischen und typischen *C. albicans*-Stämmen nachweisen. Im Gegensatz dazu findet man in der Literatur, dass das NAG1-Transkript in nicht-induzierten Kulturen nicht gebildet wird und die Transkription erst innerhalb von 8 min nach Zugabe von GlcNAc einsetzt [Kumar et al., 2000]. Jedoch beschreibt die Arbeitsgruppe um Yamada-Okabe, dass bei *C. albicans*, die in Anwesenheit von Glucose und Galaktose angezüchtet wurden, NAG1-mRNA nachweisbar ist. Bei Wachstum in Anwesenheit von GlcNAc nimmt die Menge der mRNA zu [Yamada-Okabe et al., 2001]. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die hier genutzte Methode zur Ermittlung der mRNA-Menge sensitiv genug ist, um Unterschiede in der Menge der NAG1-mRNA darzustellen. Es ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob das Ausmaß der Induktion bei typischen und atypischen Stämmen unterschiedlich ist, so dass ein Defekt in der Promotor-Region nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Untersuchungen am NAG1-Promotor haben gezeigt, dass sich NAG1 und N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase (DAC1) den Promotor teilen. Allerdings ist die Leserichtung von DAC1 entgegengesetzt zu der von NAG1 [Kumar et al., 2000]. Es wäre interessant zu untersuchen, ob es Unterschiede in der DNA-Sequenz der Promotor-Region bei den typischen und atypischen Stämmen gibt und ob die Induzierbarkeit des Enzyms GlcNAc-6-Phosphat-Deacetylase bei den atypischen Stämmen ebenfalls eingeschränkt ist.

Da der Promotor für die NAG1 in *C. albicans* sequenziert ist [Kumar et al., 2000], könnten Vergleiche der Promotorsequenzen bei den typischen und atypischen Stämmen Auskunft über mögliche Mutationen geben. Letztendlich kann die Aktivität der verschiedenen Promotoren jedoch nur durch geeignete Modellsysteme ermittelt werden [Theiß et al., 2002].

Der Fakt, dass sich Grundaktivität und Expression von Nag1 bei typischen und atypischen Stämmen nicht signifikant unterscheiden und die Enzymaktivität bei atypischen nicht stimuliert werden kann, macht eine post-translationelle Aktivierung des Enzyms wahrscheinlich.

Untersuchungen mit Null-Mutanten des NAG1 (*nag1*) zeigten, dass diese nicht auf YNB-Nährboden mit GlcNAc als Nährstoff wachsen können. Dies zeigt, wie wichtig NAG1 für den Stoffwechselweg von GlcNAc ist [Yamada-Okabe et al., 2001]. Weiterhin zeigten die Null-Mutanten *nag1*, *canag2* (DAC1, N-Acetylglucosamin-6-Phosphat-Deacetylase) und *canag5* (N-Acetylglucosamin-6-Phosphat Kinase) eine verminderte Virulenz, was darauf hinweist, dass der GlcNAc-Stoffwechsel mit der Virulenz von *C. albicans* assoziiert ist [Yamada-Okabe et al., 2001]. Diese Erkenntnis stimmt mit den Beobachtungen zu den atypischen *C. albicans* überein, bei denen die klinischen Daten zu den Patientinnen auf eine verminderte Virulenz dieser Stämme hindeutet [Tietz et al., 1995].

Die atypischen Stämme waren nicht in der Lage, auf Reisagar Chlamydosporen zu bilden, und die Bildung von Pseudohyphen war stark verlangsamt. Da nur die beiden Arten *C. albicans* und *C. dubliniensis* Chlamydosporen ausbilden, wird diese Eigenschaft zur Differenzierung von *Candida*-Spezies genutzt. Der Transkriptionsfaktor Efg1p spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Chlamydosporen und von Pseudohyphen [Sonneborn et al., 1999a; Stoldt et al., 1997]. Homozygote Null-Mutanten des *efg1* sind nicht mehr in der Lage, Chlamydosporen zu bilden. Besitzen sie jedoch ein funktionierendes Allel des *efg1*, so ist die Bildung von Chlamydosporen nicht beeinträchtigt [Sonneborn et al., 1999a]. Bei der Induktion von Pseudohyphen kommt es zu einer Abnahme der EFG1-mRNA-Konzentration [Sonneborn et al., 1999a]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten typischen und atypischen Stämmen konnte kein Unterschied in der Expression des *efg1*-Gens festgestellt und als Ursache für die fehlende Bildung von Chlamydosporen identifiziert werden.

Untersuchungen an Null-Mutanten des NAG1 zeigten, dass diese Pseudohyphen in Serum bilden, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie der Wildtyp [Yamada-Okabe et al., 2001]. Dies könnte zumindest die verlangsamte Bildung von Pseudohyphen bei den atypischen *C. albicans* erklären.

#### **4.3 Analyse der NAG1-Sequenzen bei typischen und atypischen *C. albicans*-Stämmen**

Die SSCP-Analyse ermöglicht zunächst ein Screening nach Mutationen in der DNA-Sequenz im NAG1-Gen. Hierbei zeigen sich Unterschiede in den SSCP-Mustern zwischen den atypischen und den typischen *C. albicans*. Für die 39 analysierten Stämme wurden 13 verschiedene SSCP-

Muster erhalten; wobei bei den 27 atypischen *C. albicans*-Stämmen nur zwei Muster unterschiedlich waren (siehe Abbildungen 3.5 und 3.6). Die atypischen Stämme wiesen ein weitgehend homogenes Muster auf, während die typischen *C. albicans*-Stämme heterogen mit fast individuellen Mustern erschienen. Um die Mutationen zu identifizieren, die den verschiedenen SSCP-Profilen zu Grunde liegen, wurden die NAG1-Gene von 35 Stämmen (12 typische und 23 atypische) sequenziert.

Durch die Sequenzanalyse des NAG1 in ausgewählten Isolaten (siehe Tabelle 3.2) wurden insgesamt 21 Basenaustausche in der DNA-Sequenz nachgewiesen. Diese betrafen sowohl typische als auch atypische Stämme. Von diesen Mutationen waren 14 neutral, d. h. ohne Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz. Drei der 7 sense-Mutationen betrafen nur typische Stämme, und eine kam bei allen atypischen und neun typischen Stämme vor.

Nur bei den atypischen Stämmen AM 1649 und AA 1622b wurde ein Austausch der neutralen Aminosäure Glycin durch die basische Aminosäure Arginin gefunden. Bei den anderen atypischen Stämmen, also mit Ausnahme von AM 1649 und AA 1622b, wurden zwei Mutationen nachgewiesen, die zu einer Änderung der Aminosäure-Sequenz führten.

- Austausch der sauren Aminosäure Glutaminsäure (Gly112) durch die basische Aminosäure Lysin (Lys112)
- Austausch der neutralen Aminosäure Alanin (Ala145) durch die ebenfalls neutrale Aminosäure Threonin (Thr145).

Die Austausche der Glutaminsäure durch Lysin und Alanin durch Threonin bei den atypischen Stämmen (außer AM 1649 und AA 1622b) sowie der Austausch des Glycin (Gly72) durch Arginin (Arg72) bei AM 1649 und AA 1622b können Polarität und Konformation der jeweiligen Proteine verändern. Glycin hat unpolare und ungeladene, Threonin polare aber ungeladene, Glutaminsäure negativ geladene und Arginin und Lysin positiv geladene Seitenketten. Jede Mutation, die zu einer Veränderung von Polarität und Ladung von Aminosäuren führt, kann zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins führen. Die Struktur und der katalytische Mechanismus des Enzyms GNPDA (hier NagB) ist bei *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgiebig untersucht worden [Oliva et al., 1995; Horjales et al., 1999]. Vergleicht man die Proteinsequenzen von *C. albicans* und *E. coli* [Altschul et al., 1997], so sind diese zu 48 % identisch. Vergleicht man die gefundenen Ergebnisse mit den Daten aus der Literatur, so betreffen die Mutationen keine der Aminosäuren im aktiven Zentrum (*E. coli/C. albicans*: Asp72/Asp68, Asp141/Glu137, His143/His139, Glu148/Glu144) [Oliva et al., 1995; Horjales et al., 1999;

Montero-Moran et al., 2001]. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die fehlende Verwertung der Aminosucker GlcN und GlcNAc der atypischen Stämme durch ein verändertes aktives Zentrum verursacht wird, zumal bei beiden Gruppen eine Grundaktivität des Enzyms nachweisbar ist.

Wahrscheinlicher liegt die Ursache bei der Regulation der Desaminase-Aktivität. Obwohl die Proteinsequenz des Enzyms von *E. coli* und *C. albicans* ähnlich sind, unterscheiden sie sich in ihrer Quartär-Struktur. Während das Enzym von *E. coli* ein Hexamer ist und durch N-Acetylglucosamin-6-Phosphat (GlcNAc6P) allosterisch aktiviert wird [Horjales et al., 1999; Montero-Moran et al., 2001], ist die Desaminase von *C. albicans* bestenfalls ein Dimer und wird durch GlcNAc6P nicht beeinflusst [Natarajan and Datta, 1993]. Im Vergleich zum NagB von *E. coli* wurden Struktur und Kinetik des NagB-Gen, der monomeren GNPDA von *Bacillus subtilis*, untersucht [Vincent et al., 2005]. Im Alignment *B. subtilis*/*C. albicans* [Altschul et al., 1997] sind 48 % der Proteinsequenz identisch. Die monomere GNPDA von *B. subtilis* kann ebenso wie die von *C. albicans* nicht durch GlcNAc6P allosterisch aktiviert werden [Vincent et al., 2005].

Die Untersuchungen am NagB-Gen von *E. coli* und *B. subtilis* deuten darauf hin, dass die mangelnde Induzierbarkeit des NAG1-Gens bei den atypischen *C. albicans*-Stämmen eher auf durch die nachgewiesenen Aminosäure-Austausche bedingten Konformationsänderungen des Proteins zurückzuführen sind, die eine Aktivitätssteigerung des Enzyms in Gegenwart von GlcNAc verhindern. Es müssten Strukturanalysen angeschlossen werden, um diese Vermutung zu erhärten.

#### **4.4 Phylogenetische Untersuchungen**

Die in dieser Arbeit basierend auf den DNA-Sequenzen erstellten phylogenetischen Bäume (siehe Abbildungen 3.7 und 3.8) weisen eine mit 91 % statistisch gut abgesicherte Gruppe auf, der alle atypischen *C. albicans* mit Ausnahme der Stämme AM 1649 und AA 1622b angehören. Die übrigen Stämme sind sehr variabel. Betrachtet man den Baum, der auf den Proteinsequenzen beruht, so zeigt sich auch hier eine Gruppe der atypischen Stämme, deren statistische Absicherung jedoch nur bei 60 % liegt (siehe Abbildungen 3.9 und 3.10). Dies ist wahrscheinlich durch die geringere Anzahl parsimony-informativer Charaktere bedingt.

Populationsgenetische Untersuchungen wurden bereits an *C. albicans*-Stämmen aus unterschiedlichen Regionen durchgeführt, u. a. an den atypischen Stämme aus Angola und Madagaskar, mit Hilfe eines PCR-Fingerprinting [Pinto de Andrade et al., 2000] und einer Sequenzanalyse des nukleären 26S (18S) rDNA-Gens [Forche et al., 1999]. Die von der Arbeitsgruppe um Pinto de Andrade untersuchten 212 Stämme zeigten 87 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Genotypen, wobei die typischen und atypischen Populationen aus Afrika eine

geringere Variabilität im Genotyp als die Populationen aus Europa (Portugal und Deutschland) hatten. Insgesamt hatten 15 der 22 atypischen Stämme aus Afrika einen identischen Genotyp [Pinto de Andrade et al., 2000]. Diese früheren Untersuchungen zeigen überwiegend klonale Populationsstrukturen bei *C. albicans*, vor allem für die atypischen Stämme. Die im Gegensatz zu den typischen Stämmen nahezu identischen NAG1-Sequenzen bei den atypischen Stämmen bestätigen diesen Befund.

Tietz und Mitarbeiter schlugen auf Grund der fehlenden Chlamydosporenbildung, des veränderten Assimilations-Musters und der Ergebnisse der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) vor, die atypischen Isolate in eine neue Spezies, *Candida africana*, einzugruppieren [Tietz et al., 2001]. Die Ergebnisse der FT-IR zeigten, dass die atypischen *Candida*-Stämme ein von den typischen *C. albicans* und von *C. dubliniensis* abweichendes Cluster bildeten [Tietz et al., 2001]. Bei der FT-IR-Technik wird das Spektrum des von zellulären Bestandteilen absorbierten Infrarot-Lichts gemessen. Vergleicht man diese „Fingerprint“-ähnlichen Spektren mit einem Referenzspektrum, können Mikroorganismen identifiziert werden. Jedoch müssen die Parameter zur Anzucht (Kulturmedium, Temperatur, Zeit) streng standardisiert werden, da diese einen starken Einfluss auf das FT-IR-Spektrum haben [Wenning et al., 2002]. Die Ergebnisse molekularer Charakterisierungen sind hierzu widersprüchlich. Mit der PCR-Fingerprint-Technik, welche DNA-Polymorphismen in der genomischen DNA von Pilzen mit Hilfe von Einzelprimern (z. B. T3B, M13) in der PCR aufdeckt, wurden bereits erfolgreich epidemiologische Untersuchungen von klinischen *C. albicans*-Stämmen durchgeführt [Schönian et al., 1993, Schönian et al., 1996]. Insbesondere die mit dem Primer T3B erzeugten PCR-Fingerprints von atypischen *C. albicans*-Stämmen waren denen der typischen Stämme sehr ähnlich, während sie sich von denen anderer *Candida*-Arten deutlich unterschieden [Tietz et al., 1995]. Forche und Mitarbeiter (1999) führten eine Sequenzanalyse des nukleären 26S (18S) rDNA-Gens durch. Sie zeigten, dass die atypische Population aus Angola 33 % weniger Mutationen im Vergleich zur typischen Population aufwies. Diese Stämme waren eindeutig näher mit *C. albicans* verwandt als die neu etablierte Spezies *C. dubliniensis* [Forche et al., 1999]. Untersuchungen von Fotedar und Al-Hedaithy zur Brauchbarkeit von CHROMagar zur Identifizierung von Chlamydosporen-negativer *C. albicans* ergaben, das atypische *C. albicans* nach 48 h mit jeweils 100% Spezifität und Sensitivität nachgewiesen werden konnten [Fotedar and Al-Hedaithy, 2003]. All diese Ergebnisse lassen eher darauf schließen, dass die atypischen Stämme keine eigenständige *Candida* spp. sondern eine Untergruppe von *C. albicans* darstellen.

Aufgrund der stark variierenden, fast individuellen SSCP-Muster der typischen Stämme sollte geprüft werden, ob die NAG1-Sequenzen sinnvoll für phylogenetische und epidemiologische Untersuchungen innerhalb der Art *C. albicans* eingesetzt werden können.

#### **4.5 GlcNAc-Stoffwechsel und Virulenz**

In verschiedenen Publikationen wurde diskutiert, dass nur pathogene Hefen in der Lage waren, GlcNAc als Kohlenstoffquelle zu nutzen [Singh and Datta, 1979a; Natarajan and Datta, 1993]. Ein Defekt im GlcNAc-Stoffwechsel ruft eine verminderte Virulenz hervor, dies wurde von Singh, Ghosh und Datta in einem systemischen Candidiasis-Modell in Mäusen untersucht [Singh et al., 2001]. Es ist unbekannt inwieweit die Ergebnisse mit diesen experimentellen Untersuchungssystemen mit den Eigenschaften der natürlichen Isolate, die GlcNAc nicht als Kohlenstoffquelle nutzen können, vergleichbar sind.

Die in dieser Arbeit untersuchten typischen und atypischen Isolate stammten zu einem Großteil von Frauen, die an einer *Candida*-bedingten Vaginitis litten. Prinzipiell sind diese Stämme daher in der Lage, eine Erkrankung hervorzurufen. Allerdings wurden wesentlich häufiger typische (80 %) als atypische (47 %) Stämme bei den Patientinnen isoliert [Tietz et al., 1995]. Deshalb wird eine verminderte Virulenz der letzteren postuliert. Ob die atypischen Isolate tatsächlich ein vermindertes Pathopotential besitzen, welches durch den Defekt im GlcN- und GlcNAc-Stoffwechsel bedingt ist, muss durch weitere *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen geklärt werden.