DIAGNOSTIK UND THERAPIE DER PILZKRANKHEITEN UND NEUERE ERKENNTNISSE IN DER BIOCHEMIE DER PATHOGENEN PILZE

VORTRÄGE DER
6. WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNG DER
DEUTSCHSPRACHIGEN MYKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
IN WIEN
VOM 15. BIS 17. JULI 1966

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. HANS GÖTZ
KLINIKUM ESSEN DER RUHRUNIVERSITÄT BOCHUM
UND
DR. HANS RIETH
HAMBURG

UNTER MITARBEIT VON

DR. OTTO MALE
I. UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK IN WIEN
UND
UNIV.-DOZ. DR. JOSEFINE THURNER
II. UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK IN WIEN

MIT 178 TEXTABBILDUNGEN

1970
GROSSE VERLAG
BERLIN

Hautklinik der Medizinischen Akademie Erfurt
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. G. Piper)
und der Hautklinik der Comenius-Universität zu Bratislava
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. L. Chmel)

Enzymchemische Untersuchungen an Sproßpilzen

H. A. Koch, Erfurt, und Yvonne Koch, Bratislava

Seit längerer Zeit befassen wir uns mit Enzymnachweisen bei Dermatophyten und Sproßpilzen. Die Fortschritte der Enzymhistochemie ermöglichen den Nachweis zahlreicher Fermente in Geweben und Zellen. Wir haben unter den Sproßpilzen bis jetzt nur Vertreter der Gattungen Candida und Cryptococcus untersucht. Dabei interessieren uns neben den intrazellulären Enzymen vor allem jene, welche die Pilze zum Abbau lebenden Gewebes befähigen.

Zunächst haben wir eingehend die Kryptokokkose des Zentralnervensystems von weißen Ratten untersucht, worüber der eine von uns bereits berichtet hat (Koch u. Osske 1965).

Bei diesen Versuchen werden weiße Ratten auf intravenösem Wege mit Cryptococcus neoformans infiziert, die Hirne dieser Tiere auf dem Kryostamikrotom geschnitten und die Reaktionen ausgeführt. Bei insgesamt 15 Enzymnachweisen konnten folgende Enzyme von uns nachgewiesen werden (**Tab. 1**).

Tabelle 1: Enzymhistochemische Reaktionen an Cryptococcus neoformans bei der Kryptokokkose des ZNS von weißen Ratten

Ferment	Cytoplasma	Schleimkapsel	Umgebung
1. Alkalische Phosphatase	—	—	—
2. Saure Phosphatase	+	+	—
3. ATP-ase	—	—	—
4. AMP-ase	+	+	—
5. unspezifische Esterase	—	—	—
6. AChE-ase	—	—	—
7. Aminopeptidase	+	—	+
8. Monoaminooxydase	—	—	—
9. Succinatdehydrogenase	—	—	—
10. $NADH_2$-Tetrazoliumsalzred.	+	—	—
11. $NADPH_2$-Tetrazoliumsalzred.	—	—	—
12. Lactatdehydrogenase	+	—	—
13. Isozitratdehydrogenase	—	—	—
14. Alkoholdehydrogenase	—	—	—
15. Aldolase	+	—	—

1. *Saure Phosphatase:* Sowohl mit der Bleisalzmethode als auch mit der Kupplungsreaktion kann im Protoplasma fast aller Pilze eine starke Fermentaktivität nachgewiesen werden. Eine Zuordnung zu bestimmten Zellstrukturen ist nicht möglich. Außerhalb der Pilze ist besonders im Randgebiet der Herde, der Trümmerzone, eine starke Fermentaktivität nachweisbar.

2. *AMP-ase:* Neben granulären Strukturen im Protoplasma zeigt die Schleimkapsel eine starke Enzymaktivität. In den Kontrollschnitten, die anstelle von AMP mit Glyzerinphosphat inkubiert wurden, ist die Schleimkapsel ebenfalls tingiert, jedoch deutlich schwächer.

3. *NADH-Tetrazoliumsalzreduktase* (Nicotinamid-adenindinukleotid-H-Tetrazoliumsalzreduktase), Lactatdehydrogenase und Aldolase: Diese Enzyme konnten im Pilz nachgewiesen werden, wobei granuläre Formazanniederschläge in den Cryptococcuszellen entstehen. Mit der von uns durchgeführten Aldolasereaktion wird neben diesem Enzym, einer Komponente der Glykolyse, auch die NAD-abhängige Glyzerinaldehyddehydrogenase erfaßt. Der Nachweis dieser Fermente in Cryptococcus neoformans weist auf einen intensiven Kohlenhydratabbau hin, wobei es sich wahrscheinlich um eine anaerobe Glykolyse handelt. Bei Kultur auf künstlichen Nährböden konnte bei Cryptococcus neoformans Succinatdehydrogenase nachgewiesen werden (vgl. THIANPRASIT und BRAUN-FALCO, 1965). Der von uns verwendete Stamm besitzt in der parasitischen Phase keine Dehydrogenasen des Zitronensäurezyklus in nachweisbaren Mengen.

4. *Aminopeptidase*: Dieses Enzym konnte im Pilz in einem oder mehreren Bläschen unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Diese kleinen Blasen sind meistens rund und scharf begrenzt. Dabei ist der Reaktionsausfall bei pH 6,5 am stärksten, bei pH 5,5 nur noch sehr schwach. Nach Fixierung

der Kryostatschnitte konnten wir hohe Fermentaktivität in der Umgebung der Pilzzellen nachweisen. Einige Bilder sprechen dafür, daß der Inhalt der kleinen Blasen an die Umgebung abgegeben wird. Die Aminopeptidase ist eine Komponente des proteolytischen Enzymkomplexes, mittels dessen der Pilz lebendes Gewebe abbaut. Nach Niemi und Ikonen 1960 sowie nach eigenen Untersuchungen (Osske, Koch, und Jänisch, 1966) kann Aminopeptidase im normalen Rattenhirn nicht festgestellt werden.

Bei allen positiven Enzymnachweisen erweisen sich einige wenige Pilzzellen als inaktiv. Durch Ausstrichpräparate konnten wir ausschließen, das diese Inaktivität einiger Zellen auf Schnitteffekte zurückzuführen ist, ferner konnten wir zeigen, daß es sich auch nicht um bereits abgestorbene Pilze handelt. Es dürfte sich dabei vielmehr um Zellen handeln, die sich in einer gewissen Ruhephase befinden. Dieser Befund steht möglicherweise mit dem langsamen Wachstum des Cryptococcus neoformans in Zusammenhang.

Wir haben uns in weiteren Versuchen besonders mit dem Nachweis der Aminopeptidase befaßt. Zunächst haben wir versucht, das Hirn weißer Ratten mit folgenden Cryptococcusarten zu infizieren: Cryptococcus neoformans, C. diffluens, C. gastricus, C. terreus, C. skinneri, C. terricolus. Nur durch C. diffluens konnte nach intracerebraler Verabreichung eine Kryptokokkose erzeugt werden. Es gelang auch hier, einen positiven Aminopeptidase-Nachweis zu führen. Bei den genannten Cryptococcusarten sowie 6 Arten der Gattung Candida (**Tab. 2**) haben wir Aminopeptidase-Aktivität nach Züchtung in verschiedenen Nährmedien untersucht. Dabei ist überraschend festzustellen, daß auch in solchen Nährmedien, die nur Glutaminsäure als Stickstoffquelle enthalten, positive Aminopeptidase-Reaktionen nachweisbar sind. Ähnliche Befunde konnten wir auch bei Dermatophyten erheben. Wir können dabei nachweisen, daß sowohl bei Der-

Tabelle 2: Enzymhistochemischer Nachweis der Aminopeptidase (pH 6,5) bei Hefen

	Pepton-Glukose Medium	Glutaminsäure Glukose Medium
Cryptococcus neoformans	+	+
Cryptococcus diffluens	+	—
Cryptococcus gastricus	—	—
Cryptococcus terreus	+	+
Cryptococcus skinneri	—	—
Cryptococcus terricolus	+	+
Candida albicans	+	+
Candida tropicalis	+	+
Candida pseudotrop.	+	+
Candida guilliermondii	+	+
Candida parapsilosis	+	+
Candida krusei	+	+

matophyten als auch bei anderen keratinophilen Pilzen (z. B. Ct. serratus, A. curreyi) die Aminopeptidase-Produktion vom Substratangebot bzw. der Stickstoffquelle abhängig ist, d. h., daß bei der Biosynthese der Aminopeptidase induktive Vorgänge wirksam werden. In weiteren Untersuchungen werden wir uns besonders mit diesem Problem befassen.

Literatur

1. Koch, H. A., und G. Osske: Untersuchungen zur Enzymhistochemie von Cryptococcus neoformans. Vortrag Internat. Symp. Hefeprotoblasten, Jena 1965.
2. Niemi, N., und M. Ikonen: Histochemical evidence of aminopeptidase activity in rat pineal gland. Nature **185**, 928 (1960).
3. Osske, G., H. A. Koch u. W. Jänisch: Enzymchemische Untersuchungen an Cryptococcus neoformans im Rattengehirn. Acta histochem. **24**, 1—7 (1966).
4. Thianprasit, M., u. O. Braun-Falco: Zum histochemischen Enzym-Nachweis in hautpathogenen Pilzen. Arch. klin. exp. Derm. **221**, 175—183 (1965).

Dr. habil. H. A. Koch,
Dr. Y. Koch,
Erfurt,
Klement-Gottwald-Straße 34