# 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

Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin

# Verbreitung von Peptidasen bei Dermatophyten

M. Muftic, Berlin

Die Protease der Hautpilze wurde bereits 1889 von Roberts entdeckt. Ähnliche Ergebnisse hatten Truffi, Bodin, Mac Fadyen, Fermi und Blumenthal. Zum ersten Mal beschrieb A. S. v. Mallinckrodt-Haupt (1) Dipeptidasen bei Dermatophyten. Diese Enzyme ließen sich sowohl in zellfreien Filtraten flüssiger Kulturen als auch in getrockneten Mycelpräparaten nachweisen. Ihr Wirkungsoptimum liegt zwischen pH 6,0 — 8,9 (2). F. W. Chattaway, D. A. Ellis und J. E. Barlow (3) berichteten über Peptidase-Aktivität bei Trich. rubrum, Trich. mentagrophytes, Trich. verrucosum und Microsp. canis.

Alle diese Arbeiten haben keinen Einblick in die Spezifität der Dermatophyten-Peptidasen gegeben.

Mit der gleichen Methode, die man schon früher bei Aktinomyceten, Mykobakterien, Candida und Bazillen angewandt hatte, wurde an Hand einer großen Anzahl von chromogenen Peptidase-Substraten bzw. Aminosäurenaphthylamiden das Peptidase-Spektrum von verschiedenen Dermatophyten untersucht.

## Material und Methoden

Die Dermatophyten wurden auf flüssigem Schraufstätter-Nährmedium gezüchtet. Das Mycelium wurde mit einem Homogenisator zerkleinert und 2mal durch Zentrifugieren mit Wasser gewaschen. Die Mycelsuspension wurde dann durch eine Glasfritte G2 filtriert und in einem m/15 Phosphatpuffer mit einem pH von 7,0 in einer Konzentration von 10 mg Mycel/ml suspendiert.

Zu jedem ml der Suspension werden 0,2 ml 10%iges Tween 80 und 0,1 ml einer 0,03 M Substratlösung hinzugegeben. Nach 24stündiger Bebrütungszeit bei 37 °C wird zu jedem ml der Suspension 1 ml von 0,2%iger Echtrot in 10%iger Tween-80-Lösung einpipettiert. Die Farbextinktion wurde bei 530 m$\mu$ abgelesen.

## Diskussion der Ergebnisse

Aus den **Tabellen 1 und 2** ist ersichtlich, welche Stämme und welche Substrate verwendet wurden. Aminosäurenaphthylamide wurden immer in beiden Isomeren $\alpha$ und $\beta$ untersucht. Jedes Substrat wurde auch mit freien und geschützten Aminogruppen zugegeben. Einige Substrate wurden als Basen in alkoholischer Lösung und andere als Salze in wäßriger Lösung verwendet.

Es wurden die L- und D-Formen von Aminosäuren benutzt. D-Aminosäurenaphthylamide werden von den untersuchten Dermatophyten nicht gespalten. Eine Ausnahme bildet T. asteroides, der D-Ala-$\alpha$-NH. HBr spaltet.

**Tabelle 1: Peptidase-Spektrum von Dermatophyten (I. Teil)**

| | 55 F M. gypseum | 55 E M. gypseum | 55 G M. canis | 55 C M. canis | 55 B M. canis | 51 B E. floccosum | 51 A E. floccosum | 43 F T. granulosum | 43 D T. asteroides | 41 F T. quinckeanum | 41 E T. mentagrophytes | 41 D T. mentagrophytes | 41 C T. rubrum | 41 B T. rubrum | 39 F T. tonsurans | 39 E T. tonsurans | 39 C T. ferrugineum | 39 A T. megninii |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cbo-D-Ala-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-D-ala-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-L-Ala-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-β-Ala-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| DL-Ala-β-NA . H Br | + | + | + | + | + | + | + | ○ | + | ○ | ○ | ± | ± | + | ± | + | + | + |
| H-β-Ala-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Ala-α-NA . H Br | + | + | ○ | ± | + | + | + | ○ | + | ○ | ○ | ± | ○ | + | + | + | + | + |
| H-L-Ala-β-NA | + | + | + | ± | + | + | + | ○ | + | ± | ○ | ± | ± | + | ± | + | + | + |
| H-D-Ala-α-NA · HBr | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-D-Ala-β-NA · HBr | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Arg-β-NA-carbonat | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| NA-Benzyol-DL-Arg-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Asp-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Asp-β-NA · TFA | ± | ± | ○ | ○ | ○ | ± | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-α-L-Asp-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| BOC-L-L-Asp-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Cystin-Di-β-NA | ± | + | ○ | ○ | ± | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ± |
| H-L-Glu-α-NA . 1,16 HBr | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cbo-L-Glu-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-α-L-Glu-β-NA | ± | ± | ○ | ○ | ○ | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| L-Gly-β-NA | + | + | ± | ± | ± | + | + | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | + | ○ | ± | ± | ○ |
| H-L-His-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-D-Leu-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-D-Leu-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-D-Leu-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-D-Leu-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Leu-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-L-Leu-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Leu-β-NA . HCl | + | + | + | ± | ± | + | + | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ± | + | ± | ± | + | + |

**Tabelle 2: Peptidase-Spektrum von Dermatophyten (II. Teil)**

| | 55 F M. gypseum | 55 E M. gypseum | 55 G M. canis | 55 C M. canis | 55 B M. canis | 51 B E. floccosum | 51 A E. floccosum | 43 F T. granulosum | 43 D T. asteroides | 41 F T. quinckeanum | 41 E T. mentagrophytes | 41 D T. mentagrophytes | 41 C T. rubrum | 41 B T. rubrum | 39 F T. tonsurans | 39 E T. tonsurans | 39 C T. ferrugineum | 39 A T. megninii |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H-L-Leu-4-Methoxy-β-NA | ± | ± | ± | ○ | ○ | ± | ± | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Lys-β-NA · carbonat | + | + | + | + | + | + | + | ± | ± | ± | ○ | + | + | + | + | + | + | + |
| H-L-Met-α-NA · HCl | ○ | ○ | ± | + | ± | ○ | ± | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ± |
| H-L-Met-β-NA · HCl | + | + | ± | ± | + | + | + | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ± | + | + | + | + | + |
| H-L-Phe-α-NA · HBr | + | + | ○ | + | ± | + | + | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ± | + | + | ± | + | ± |
| Cbo-L-Phe-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-D-Phe-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-D-Phe-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-α-L-Phe-β-NA | + | + | ○ | + | ± | + | + | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ○ | + | ± | ± | + | ± |
| H-L-Pro-α-NA · HBr | + | + | ± | + | + | + | + | ± | ± | ○ | ○ | + | + | + | + | + | + | + |
| Cbo-L-Pro-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Pro-β-NA · HBr | ○ | ○ | + | + | + | ○ | + | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | + | ○ | ± | + | + |
| Cbo-L-Pro-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-L-Pro-L-Ser-β-NA · HBr · $H_2O$ | ± | ± | ○ | ○ | ± | ± | + | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ○ | ± | ± | ± | ± | ○ |
| H-L-Pro-Gly-α-NA · HBr | + | + | ○ | ○ | ± | ○ | + | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ○ |
| H-L-Pro-Gly-β-NA · HBr | ± | ± | ± | ○ | ± | ○ | + | ○ | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ○ |
| H-L-Try-β-NA | ± | ± | ○ | ○ | ± | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ○ |
| H-L-Tyr-β-NA | + | + | ○ | ± | ± | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | + | ± | + | + | ± |
| H-L-Val-α-NA | + | + | ○ | ○ | ± | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | + | ± | ± | + | ± |
| BOC-L-Val-α-NA | + | + | ○ | ○ | ± | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | + | ± | ± | + | ○ |
| H-L-Val-β-NA | + | + | ○ | ○ | + | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | + | ± | + | + | ± |
| Cbo-L-Val-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-D-Val-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| BOC-D-Val-α-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| H-D-Val-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cbo-D-Val-β-NA | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| L-Val-α-NA · HCl | + | + | ○ | ○ | ○ | + | + | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ± | ○ | ○ | ± | ○ |
| D-Val-α-NA · HCl | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

Auch geschützte Aminosäurenaphthylamide werden allgemein nicht hydrolisiert, mit einer Ausnahme: BOC-L-Val-α-NA, das von mehreren Dermatophyten gespalten wurde.

Einige Substrate, die zu keiner der obengenannten Gruppen gehören, werden von keinem der untersuchten Dermatophyten gespalten:

1. H-β-Ala-β-NA
2. H-L-Arg-β-Na-carbonat.
3. H-L-Leu-α-NA

Es gibt Substrate, die von allen untersuchten Stämmen gespalten werden, wie z. B.: H-L-Glu-α-NA.1,16 HBr. Es gibt aber auch andere, die nur von einem Stamm oder einer Art gespalten werden. Diese Substrate könnten besonders interessant für einen taxonomischen Schlüssel sein.

Peptidasen bei Dermatophyten sind im allgemeinen L-Aminopeptidasen. Sie haben wahrscheinlich eine sehr strenge Selektivität. Aufgrund dieser spezifischen Spektren könnte man eine Methode ausarbeiten, die bei einem schnellen Identifizierungsverfahren sehr nützlich sein würde.

**Literatur**

1. Arch. f. Dermat. **3**, 154 (1928).
2. Z. f. Parasitenkunde **5**, 217 (1933).
3. J. invest. Dermat. **41**, 31—39 (1963).

Dr. M. Muftic,
1 Berlin 65,
Sellerstr. 6-8