

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Molekulare Charakterisierung pH-regulierter Gene  
bei der humanpathogenen Hefespezies *Candida  
dublinskiensis* und ihr Nutzen für die  
epidemiologische Diagnostik

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Oliver Kurzai  
aus Würzburg

Würzburg, Juli 2001

Referent: Prof. Dr. med. Matthias Frosch  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Hacker  
Dekan: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2002

Der Promovend ist Arzt

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Einführung</b>	<b>1</b>
I.1. Biologische Grundlagen der medizinischen Mykologie	1
I.2. Das Genus <i>Candida</i> und <i>Candida albicans</i>	2
I.3. <i>Candida dubliniensis sp. novum</i>	3
I.6.1. Phänotypische Merkmale	3
I.6.2. Molekularbiologische Charakteristika	5
I.6.3. Epidemiologie	6
I.4. Pathogenitätsfaktoren von <i>Candida albicans</i>	7
I.5. pH-regulierte Gene bei <i>Candida albicans</i>	9
I.6. Regulation pH-abhängiger Genexpression bei <i>Candida albicans</i>	11
I.7. Infektionen durch <i>Candida</i>	13
I.8. Therapie von Infektionen durch <i>Candida</i> und Resistenzproblematik	15
I.9. Hypothesen und Ziele der Arbeit	17
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
II.1. Geräte	19
II.2. Bezugsfirmen	20
II.3. Verbrauchsmaterialien	20
II.4. Kits	21
II.5. Kulturbedingungen	21
II.5.1. Nährmedien	21
II.5.2. Supplemente und Selektionsverfahren	24
II.5.3. Stammsammlungskulturen	24
II.6. Gebrauchslösungen	24
II.7. Sterilisationsverfahren	26
II.8. Hard- und Software	26
II.8.1. Hardware	26
II.8.2. Software	27
II.8.3. Internet-Ressourcen	27
II.9. Stämme in dieser Studie	28
II.9.1. Pilze	28
II.9.1.1. Referenzstämme	28
II.9.1.2. Gentechnisch modifizierte Stämme	29
II.9.1.3. Stämme aus dem epidemiologischen Teil der Arbeit	30
II.9.2. Bakterien	30

II.9.2.1. Referenzstämme	30
II.9.2.2. Gentechnisch modifizierte Stämme	31
II.10. Isolierung von genomischer DNA aus Hefezellen	31
II.11. Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefezellen	33
II.12. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	35
II.12.1 Plasmidisolierungskits	35
II.12.2. Schnellpräparation ohne Kit	35
II.13. Gelelektrophorese	36
II.13.1. Horizontale DNA Gelelektrophorese im Agarosegel	36
II.13.2. DNA Größenmarker	37
II.13.3. Horizontale RNA Gelelektrophorese im denaturierenden Agarosegel	38
II.14. DNA Extraktion aus einem Elektrophoresegel	38
II.15. Transfer von Nukleinsäuren auf Hybridisierungsmembranen	39
II.15.1. DNA Transfer im Southern Blot	39
II.15.2. RNA Transfer im Northern Blot	40
II.16. Hybridisierungen (DNA-DNA und RNA-DNA)	40
II.16.1. Sondenlabeling	40
II.16.2. Verwendete Sonden	40
II.16.3. Hybridisierung	41
II.17. Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	41
II.17.1. Colony PCR	42
II.17.2. Inverse PCR	43
II.18. Ammoniumacetatfällung von PCR Produkten	44
II.19. Klonierungen	44
II.19.1. Restriktionsenzyme	44
II.19.2. Sonstige für Klonierungen verwendete Enzyme	45
II.19.3. Basisplasmide	46
II.20. Sequenzierungen	47
II.20.1. Genbankregistrierungen	47
II.21. Transformation und Plasmidmultiplikation in <i>Escherichia coli</i>	47
II.21.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen	48
II.21.2. Elektroporation	48
II.22. Transformation von Hefezellen	48
II.22.1. Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetatmethode	48



III.4.6. Phänotypische Charakteristika von <i>Candida dubliniensis</i>	75
III.4.7. Kohlenhydrat Assimilation von <i>Candida dubliniensis</i>	79
III.4.8. Die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber Antimykotika	82
<b>IV. Diskussion</b>	<b>85</b>
IV.1. Biologie von <i>C. dubliniensis</i>	85
IV.1.1. <i>CdPHR1</i> und <i>CdPHR2</i> sind PHR-Homologe bei <i>Candida dubliniensis</i>	86
IV.1.2. <i>CdPHR1</i> ist funktionell homolog zu <i>PHR1</i>	86
IV.1.3. Die transkriptionelle Regulation von <i>PHR1</i> und <i>CdPHR1</i> erfolgt äquivalent.	88
IV.1.4. Die pH Kaskade hat direkten Einfluss auf die Filamentierung von <i>Candida albicans</i> .	88
IV.1.5. <i>CdPHR1</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Candida glabrata</i> .	89
IV.2. Epidemiologie von <i>Candida dubliniensis</i>	90
IV.2.1. Entwicklung eines PCR Schnelltests	90
IV.2.2. Die phänotypische Unterscheidung zwischen <i>Candida albicans</i> und <i>Candida dubliniensis</i>	90
IV.2.3. Evaluierung bisheriger epidemiologischer Studien im Hinblick auf die Güte der Diskriminationsverfahren	93
IV.2.4. Biochemische Unterscheidung zwischen <i>Candida albicans</i> und <i>Candida dubliniensis</i>	93
IV.2.5. Das Micronaut RC System	95
IV.2.6. Resistenzsituation bei <i>Candida dubliniensis</i>	95
IV.2.7. Sensibilität der Stämme in dieser Studie	96
IV.3. Bedeutung von <i>Candida dubliniensis</i> aus klinischer und mykologischer Sicht	97
<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>Anhang</b>	<b>116</b>
A.1. In dieser Studie verwendete Primer	116
A.2. Stämme im epidemiologischen Teil der Arbeit	117
A.3. Patientenzugehörigkeit der Isolate	122
<b>Publikations- und Vortragsliste des Autors</b>	<b>123</b>
<b>Danksagung</b>	<b>126</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>127</b>

## Einleitung

### I.1. Biologische Grundlagen der medizinischen Mykologie

Pilze sind eukaryontische Organismen ohne Befähigung zur Photosynthese. Von tierischen Zellen unterscheiden sich Pilzzellen unter anderem durch ihre Zellwand (Margulis und Schwartz, 2000). Diese differiert im Aufbau grundsätzlich von der bakteriellen Zellwand und besteht im Wesentlichen aus  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6- verknüpften Glukanen sowie Mannanen und Chitin (Chaffin *et al.*, 1998; Lipke und Ovalle, 1998; Smits *et al.*, 1999). Die Anzahl der bekannten Pilzspezies überschreitet bei weitem die der Bakterien und Viren (Guarro *et al.*, 1999). Nur ein Bruchteil der wahrscheinlich über 1.000.000 Arten sind als Krankheitserreger beim Menschen beobachtet worden, wobei jedoch diese Anzahl steigt (Pfaller, 1995; Fridkin und Jarvis, 1996; Guarro *et al.*, 1999).

Die taxonomische Einteilung der Pilze ist ein weitgehend ungelöstes Problem. Pilze zeigen sowohl eine mitotisch - asexuelle als auch eine meiotisch - sexuelle Vermehrung (Guarro *et al.*, 1999; Margulis und Schwartz, 2000). Man kann daher zwischen der perfekten (sexuellen = Teleomorph) und der imperfekten (asexuellen = Anamorph) Form einer Spezies unterscheiden. Biologisch werden Pilze nach der sexuellen Form eingeteilt. Diese ist jedoch bei vielen Spezies nicht bekannt oder existiert möglicherweise gar nicht. Solche Pilze werden als Deuteromyceten (*fungi imperfecti*) bezeichnet (Guarro *et al.*, 1999; Margulis und Schwartz, 2000). Ihre historische Einteilung aufgrund von phänotypischen und biochemischen Eigenschaften geriet aufgrund verschiedener Entwicklungen ins Wanken.

Für viele Deuteromyceten wurde im Nachhinein eine perfekte Form gefunden. Für diese Pilze existieren jetzt zwei Namen, wobei meist die Bezeichnung der asexuellen Form gebräuchlicher ist, da unter Kulturbedingungen oft nur diese gezüchtet wird. Beispiele hierfür sind *Candida guilliermondii* (sexuelle Form: *Pichia guilliermondii*) oder auch *Cryptococcus neoformans* (sexuelle Form: *Filobasidiella neoformans*) (Kwon-Chung und Bennett, 1978; Kozel, 1995; Kurtzman und Fell, 1998). Dabei ist es keineswegs so, dass Mitglieder eines anamorphen Genus auch zu einem Teleomorph - Genus gehören (Guarro *et al.*, 1999).

Durch molekularbiologische Untersuchungen ist es außerdem gelungen, nahe Verwandtschaften zwischen Spezies aufzuzeigen, die bis dato unterschiedlich klassifiziert wurden. Ein Beispiel hierfür ist die Eingliederung der Gattung *Torulopsis* mit der humanpathogen bedeutsamen Spezies *Torulopsis glabrata* in das Genus *Candida* (jetzt: *Candida glabrata*) (Odds, 1988). Im Zuge dieser Entwicklungen wird der Begriff der Spezies zunehmend über molekularbiologische Kriterien definiert.

largenetische Unterschiede definiert (Bruns *et al.*, 1991; Peterson und Kurtzman, 1991; Reynolds and Taylor, 1991; Blackwell, 1993).

## **I.2. Das Genus *Candida* und *Candida albicans***

*Candida* ist ein komplexes Genus aus zur Zeit 163 anamorphen Spezies (Kurtzman und Fell, 1998). Die teilweise beschriebenen teleomorphen Formen gehören bis jetzt 13 unterschiedlichen Genera an, von denen wiederum einige polyphyletisch aufgebaut zu sein scheinen (Guarro *et al.*, 1999). Alle diese Genera gehören jedoch zu den Ascomyceten (Guarro *et al.*, 1999; Margulis and Schwartz, 2000).

Innerhalb des Genus wird klassischerweise zwischen den einzelnen Spezies durch die unterschiedlichen Assimilationsprofile unterscheiden. Dieses Vorgehen ist auch von diagnostischer Bedeutung, da solche Assimilationsprofile mit halbautomatisierten Kulturstreifen erstellt und computerunterstützt ausgewertet werden können (Ramani *et al.*, 1998). Die Anzahl der als pathogen beschriebenen Spezies ist im Steigen begriffen und es sind mittlerweile circa 20 pathogene Spezies im Genus bekannt (Jarvis, 1995; Coleman *et al.*, 1998; Kappstein *et al.*, 1998; Guarro *et al.*, 1999). Dabei ist *Candida albicans* der bei weitem am häufigsten isolierte Erreger.

Im mikrobiologischen Labor wird *C. albicans* von anderen pathogenen Hefen durch die Fähigkeit zur Ausbildung von Keimschläuchen und Chlamydosporen unterschieden. Keimschläuche (Pseudohyphen) als elongierte Ausläufer des Zellsomas entstehen durch Knospung ohne Zellteilung unter einer Vielzahl von äußeren Bedingungen (Ernst, 2000; Abb. 1).



Abb. 1: *Polymorphismus bei C. albicans*

*C. albicans* kann in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen in verschiedenen Formen auftreten. Dazu zählen die typischen Hefezellen (links, 100x Ölimmersion), Pseudohyphen oder Keimschläuche (Mitte, 100x Ölimmersion) sowie echte Hyphen (rechts, 40x). Diese morphogenetische Flexibilität gilt als wichtiger Pathogenitätsfaktor.

Echte Hyphen sind demgegenüber durch septale Abgrenzung unizellulärer Einzelemente in einem Mycelverband gekennzeichnet (Odds, 1988; Ernst, 2000; Abb. 1). Die Fähigkeit von *C. albicans*, in diesen verschiedenen morphologischen Formen zu erscheinen, bezeichnet man als Dimorphismus oder korrekter als Polymorphismus. Chlamydosporen werden als putative Dauerformen vor allem unter Mangelbedingungen in einem (pseudo)hyphalen Verband als endständige Zellen mit dicker, doppelbrechender Wandstruktur ausgebildet (Odds, 1988).

Andere humanmedizinisch bedeutsame Erreger im Genus *Candida* sind *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* und *Candida krusei* (Hazen, 1995; Fridkin und Jarvis, 1996). Der Anteil dieser non-*albicans* Spezies unter den klinischen Isolaten nimmt ebenso wie die absolute Häufigkeit der durch *Candida* verursachten Infektionen zu (Hazen, 1995; Wingard *et al.*, 1995; Fridkin und Jarvis, 1996). An der Spitze steht hierbei *Candida glabrata*, eine Spezies, die in letzter Zeit verstärkt in den Blickpunkt der Forschung geraten ist (Cormack *et al.*, 1999; Fidel *et al.*, 1999; El Barkani *et al.*, 2000a).

### **I.3. *Candida dubliniensis* sp. novum**

#### **I.3.1. Phänotypische Merkmale**

Die ursprüngliche Beschreibung von *C. dubliniensis* erfolgte 1995 anhand der genotypischen und phänotypischen Untersuchung einer Gruppe atypischer *C. albicans* Isolate (Sullivan *et al.*, 1995). Unterschiede zu typischen *C. albicans* Referenzstämmen, die im Folgenden näher erläutert werden, führten zur Positionierung einer eigenständigen, phylogenetisch sehr nahe mit *C. albicans* verwandten Spezies, die nach der irischen Hauptstadt Dublin benannt wurde (Sullivan *et al.*, 1995; Abb. 2).

Alle diese atypischen Isolate waren aufgrund ihrer Fähigkeit, Keimschläuche und Chlamydosporen auszubilden, rou-

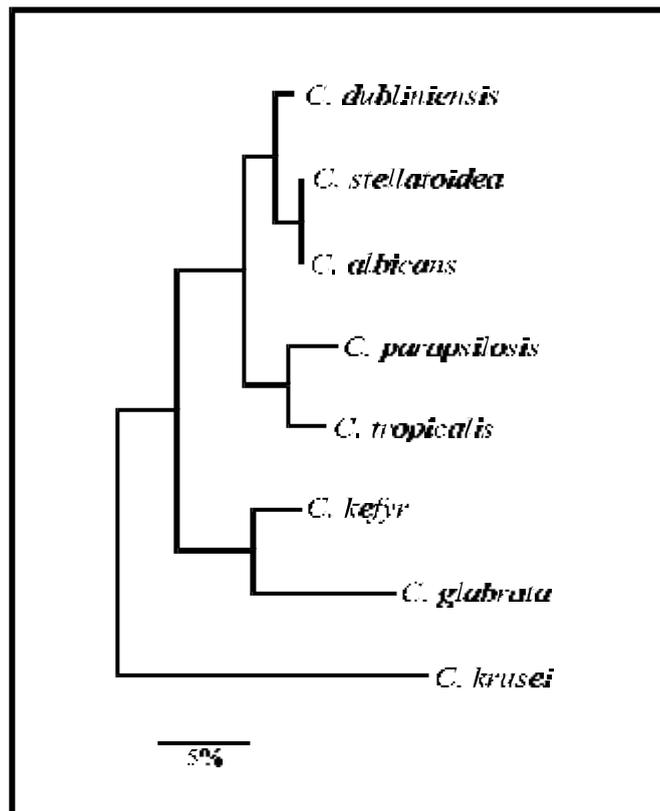


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum Wurzelloser Stammbaum basierend auf einem Alignment einer 500bp Region der V3 rDNA. Der Maßstab repräsentiert einen 5% Unterschied in der Nukleinsäuresequenz. (nach Sullivan *et al.*, 1995)

tinemäßig als *C. albicans* klassifiziert worden. Neben *C. albicans* ist *C. dubliniensis* bis dato die einzige Spezies im Genus *Candida*, die diese beiden charakteristischen Merkmale zeigt (Gilfillan *et al.*, 1998). Dies ist von besonderer Bedeutung für die mykologische Diagnostik, da die Chlamydosporenbildung auf Mangelmedien wie Reis-Tween Agar als spezifischer diagnostischer Test für *C. albicans* verwendet wird. In weitaus der meisten Zahl von Fällen werden *C. dubliniensis* Isolate daher als *C. albicans* fehlklassifiziert. Die Chlamydosporenbildung ist im Gegensatz zu den *C. albicans* Referenzstämmen als reichhaltiger beschrieben, es lassen sich Duplets und Triplets von Chlamydosporen an einzelnen Stützzellen beobachten (Sullivan *et al.*, 1995; diese Arbeit).

Von *C. albicans* Referenzstämmen unterscheiden sich *C. dubliniensis* Isolate typischerweise weiterhin durch ein reduziertes Wachstum bei 42°C und 45°C sowie ein abweichendes Kohlenhydrat-Assimilationsmuster (Pinjon *et al.*, 1998; Sullivan und Coleman, 1998; diese Arbeit). Im Schnelltestsystem API ID 32C sind insbesondere die fehlenden Assimilationen von D-Xylose,  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid und DL-Lactat auffällig (Salkin *et al.*, 1998). Diese Unterschiede waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, wobei sich eine starke Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Testsystem zeigte (Sullivan *et al.*, 1995; Salkin *et al.*, 1998; Gales *et al.*, 2000; Pincus *et al.*, 2000; Tintelnot *et al.*, 2000).

Bereits vor der Beschreibung von *C. dubliniensis* war bekannt, dass einige atypische *C. albicans* Isolate im Gegensatz zu Referenzstämmen keine intrazelluläre  $\beta$ -Glukosidase Aktivität aufweisen (Boerlin *et al.*, 1995). Solche Isolate konnten später der neuen Spezies *C. dubliniensis* zugeordnet werden. Die Untersuchung dieser Eigenschaft in einem Assay ist allerdings relativ aufwendig (Boerlin *et al.*, 1995). *C. dubliniensis* wird jedoch typischerweise in diesem Test negativ reagieren. Demgegenüber sind nur vereinzelte Isolate von *C. albicans* beschrieben worden, die keine intrazelluläre  $\beta$ -Glukosidase Aktivität aufweisen (Odds *et al.*, 1998; Tintelnot *et al.*, 2000)

CHROMagar *Candida* ist ein diagnostisches Medium, auf dem verschiedene *Candida* Spezies aufgrund unterschiedlicher Koloniefärbungen voneinander differenziert werden können (Odds und Bernaerts, 1994). Während sich *C. albicans* Isolate meist hellgrün färben, sind *C. dubliniensis* Isolate als eher dunkelgrün beschrieben worden (Schoofs *et al.*, 1997). Die diagnostische Validität dieser Untersuchung wurde zwar bereits bei der ersten Beschreibung aufgrund intraindividuelle Schwankungen der Koloniefärbung relativiert (Schoofs *et al.*, 1997). Trotzdem fand der Test aufgrund seiner einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit weite Verbreitung als Screeningmethode (Schoofs *et al.*, 1997; Kirckpatrick *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999).

Erst kürzlich konnte in einer 25 Stämme umfassenden Studie gezeigt werden, dass *C. dubliniensis* im Gegensatz zu *C. albicans* auf Staib-Agar (*Guizotia abyssinica*-Kreatinin Agar), einem in der Diagnostik von *C. neoformans* verwendeten Medium, Pseudohyphen, Hyphen und Chlamydosporen bildet (Staib und Morschhäuser, 1999). Dieser schnelle und einfache Test wurde im Rahmen der folgenden Arbeit erstmals evaluiert und mit den Ergebnissen molekularer Verfahren korreliert.

Verschiedene andere phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Spezies sind beschrieben worden (Bikandi *et al.*, 1998; Timmins *et al.*, 1998; Velegraki und Logotheti, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999; Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 2000). Die meisten konnten sich jedoch nicht zur Differenzierung durchsetzen und werden deshalb hier nicht weiter berücksichtigt.

### I.3.2. Molekularbiologische Charakteristika

Die Klassifizierung von Deuteromyceten wie *C. albicans* und *C. dubliniensis* basiert zunehmend auf molekularen Untersuchungen. Im Vordergrund stehen hierbei Sequenzanalysen innerhalb der für ribosomale RNA kodierenden DNA Sequenzen, wie beispielsweise der V3 Region im Gen für die 25s rRNA. Die Sequenzierung dieser Region kann zur Zeit als Goldstandard der Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* betrachtet werden (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan und Coleman, 1998). Aber auch in anderen Bereichen der rDNA finden sich relevante Unterschiede (McCullough *et al.*, 1999; diese Arbeit).

Auch im Hinblick auf den Karyotyp unterscheiden sich *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Typischerweise findet man bei der neuen Spezies in Pulsfeldanalysen 10 Banden mit mindestens einer unterhalb der Größe von 1 MB, während *C. albicans* Isolate nur 7 oder 8 Banden aufweisen (Sullivan und Coleman, 1998).

Verschiedene für *C. albicans* verwendete DNA Fingerprinting - Sonden wie 27A oder repetitive Mikrosatellitensequenzen hybridisieren kaum mit genomischer DNA von *C. dubliniensis* und kürzlich wurden eigene *C. dubliniensis* fingerprinting Sonden entwickelt (Joly *et al.*, 1999). Auch andere spezifische Sonden sind beschrieben worden (Elie *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000). Unterschiede zeigen sich auch in RAPD (random amplified polymorphic DNA) Analysen beispielsweise mit CARE-2 (Morschhäuser *et al.*, 1999).

Die meisten dieser genotypischen Unterschiede wurden bereits als Unterscheidungskriterium herangezogen. Zumeist sind solche Analysen jedoch zeitaufwendig oder erfordern einen apparativen Aufwand, der bei größeren Durchlaufzahlen nicht zu realisieren wäre. Deshalb wur-

den, unter anderem im Rahmen dieser Studie, verschiedene PCR Tests entwickelt, die nach DNA-Isolierung oder mittels direkter DNA-Amplifizierung aus Koloniematerial eine schnelle und zuverlässige Unterscheidung zwischen beiden Spezies erlauben (Manarelli und Kurtzman, 1998; Donnelly *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2000)

### I.3.3. Epidemiologie

Aufgrund der Tatsache, dass die Identifizierung von *C. dubliniensis* im mykologischen Labor noch nicht routinemäßig erreicht wird, sind die Informationen zur Epidemiologie dieser Spezies zur Zeit noch begrenzt. Auffällig erscheint jedoch die enge Assoziation von *C. dubliniensis* zu oropharyngealen Infektionen bei HIV-positiven Patienten (Coleman *et al.*, 1997). Unter den oropharyngealen chlamydosporenbildenden *Candida* Isolaten aus diesem Patientenkollektiv sind bis zu 30% der neuen Spezies zuzuordnen (Kirckpatrick *et al.*, 1998; Meiller *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000; diese Studie). Die Gründe für diese Assoziation sind im Moment unklar. *C. dubliniensis* wurde auch aus anderen Infektionsorten und bei HIV negativen Patienten isoliert (Sullivan und Coleman, 1998; Meis *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2000; Polachek *et al.*, 2000). Insbesondere Patienten mit Diabetes mellitus sind in letzter Zeit als anfällig gegenüber *C. dubliniensis* beschrieben worden (Willis *et al.*, 1999; Willis *et al.*, 2000).

Fest steht, dass es sich bei *C. dubliniensis* nicht um ein lokales Phänomen handelt. Isolate dieser Spezies sind mittlerweile an Verschiedenen geographischen Lokalisationen gefunden worden (Sullivan *et al.*, 1997; Sullivan und Coleman, 1998; Salkin *et al.*, 1998; Kamei *et al.*, 2000; Sano *et al.*, 2000)

Die Gründe für das Aufkommen von *C. dubliniensis* sind ebenfalls unklar, insbesondere, da einige tierexperimentelle Daten eine niedrigere Virulenz als für *C. albicans* zeigen und *C. dubliniensis* Isolate oft niedrigere Lipase- und Proteinaseaktivität zeigen als *C. albicans* (Gillfillan *et al.*, 1998; Hannula *et al.*, 2000). Immer wieder wurde unter Hinweis auf eine eventuell beschleunigte Resistenzentwicklung bei der neuen Spezies der prophylaktische Einsatz von Azolen in Zusammenhang mit dieser Entwicklung gebracht (Moran *et al.*, 1997; Sullivan und Coleman, 1998). Allerdings zeigten sich klinische Isolate von *C. dubliniensis* in den bisher verfügbaren Studien nicht resistenter gegenüber herkömmlichen oder neuartigen Antimykotika (Moran *et al.*, 1997; Kirckpatrick *et al.*, 1998; Ryder *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 1999; Quindos *et al.*, 2000, diese Arbeit). Und auch die Mechanismen der Resistenzentwicklungen scheinen sehr ähnlich zu sein (Moran *et al.*, 1998; Ruhnke *et al.*, 2000). Erst kürzlich wurde berichtet, dass die Adhärenz von *C. dubliniensis* zu humanen Epithelzellen in Anwesenheit

von Fluconazol zunimmt, so dass möglicherweise eher eine indirekte als eine direkte Assoziation zwischen dem prophylaktischen Einsatz dieses Antimykotikums und dem Aufkommen von *C. dubliniensis* besteht (Borg von Zeppelin *et al.*, 2000a und b).

#### **I.4. Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans***

*C. albicans* ist der am häufigsten isolierte humanpathogene Pilz im klinisch-mykologischen Labor (Jarvis, 1995; Reef and Mayer, 1995; Fridkin und Jarvis, 1996). Trotz dieser Tatsache war lange nur sehr wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, die der Pathogenität von *C. albicans* zugrunde liegen. In den letzten Jahren haben jedoch vor allem zwei Entwicklungen dazu beigetragen, dass die Ansätze in diesem Forschungsbereich sich nachhaltig verändert haben. Zum einen ist hier die rasante Entwicklung der molekularbiologischen Methodik zu nennen, die es ermöglicht, bereits auf Nukleinsäureebene nach möglichen Pathogenitätsfaktoren zu suchen. Zum anderen hat bei der Untersuchung von *C. albicans* die Etablierung der phylogenetisch relativ nahe stehenden, aber apathogenen Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus der zell- und molekularbiologischen Forschung eine große Rolle gespielt. Seit 1997 ist das gesamte Genom von *S. cerevisiae* sequenziert und kartiert (Clayton *et al.*, 1997; [genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/](http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/)). Auch weite Teile der genomischen Information von *C. albicans* sind in Datenbanken verfügbar ([www.sanger.ac.uk/project/C\\_albicans/](http://www.sanger.ac.uk/project/C_albicans/), [sequence-www.stanford.edu/group/Candida/](http://sequence-www.stanford.edu/group/Candida/)). Durch Vergleiche des genomischen Repertoires beider Spezies lassen sich Rückschlüsse auf pathogenetisch bedeutsame Faktoren bei *C. albicans* ziehen (Vai *et al.*, 1996; Gale *et al.*, 1996; Gale *et al.*, 1998).

Als wesentlicher Pathogenitätsfaktor von *C. albicans* wird die Fähigkeit zur Ausbildung von filamentösen Wachstumsformen unter einer Vielzahl von äußeren Bedingungen betrachtet (Cutler, 1991; Lo *et al.*, 1997; Ernst, 2000; Abb. 1 Seite 2). Untersucht man infiziertes Gewebe histologisch, so liegt *C. albicans* meist zum Teil in filamentösen Formen vor (Odds, 1988). Studien von Mutanten, welche die Fähigkeit zur Keimschlauchbildung verloren haben, legen einen engen Zusammenhang zwischen Dimorphismus und Pathogenität nahe und viele Mutanten, die *in vitro* die Fähigkeit zur Ausbildung von Keimschläuchen verloren haben, zeigen auch im Tiermodell eine reduzierte Virulenz (Lo *et al.*, 1997).

Das morphogenetische Ereignis des Umschaltens von Sprosshefewachstum zu Keimschlauchbildung ist auf molekularer Ebene höchst vielfältig reguliert (Liu *et al.*, 1994; Braun und Johnson, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Csank *et al.*, 1998; Brown Jr. *et al.*, 1999; Brown und

Gow, 1999; Loeb *et al.*, 1999; Ernst, 2000). Ebenso komplex ist die Vielzahl von äußeren Bedingungen, die *in vitro* zu einer Induktion der Keimschlauchbildung führen (Odds, 1988). Temperatur, pH, einzelne Chemikalien, aber auch komplexe Medien wie Serum sind zur Induktion geeignet. Viele dieser Faktoren, beispielsweise Temperatur, pH oder Serum, sind wichtige Determinanten ökologischer Nischen im humanen Wirtsorganismus. Letztendlich scheinen eine Vielzahl von hypheninduzierenden Faktoren in zwei zentralen Regulatoren, den Transkriptionsfaktoren Efg1 und Cph1 zu münden (Liu *et al.*, 1994; Stoldt *et al.*, 1997; Brown und Gow, 1999; Ernst, 2000).

Gerade im Hinblick auf das Verständnis der molekularbiologischen Organisation des pH-regulierten Dimorphismus sind in letzter Zeit große Fortschritte gemacht worden. Die Effekte, die *in vitro* durch Veränderungen von den zwei herausragenden Wirtsnischendeterminanten pH und Temperatur hervorgerufen werden, waren bereits seit den 70er Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Auger und Joly, 1977). Die Grenzlinien des pH-abhängigen Dimorphismus wurden schließlich 1984 beschrieben (Buffo *et al.*, 1984). Demnach sind eine Temperatur von  $> 35,5^{\circ}\text{C}$  und ein pH Wert  $> 6,0$  notwendig für die Induktion der Keimschlauchbildung im pH-abhängigen Dimorphismus (Abb. E1).

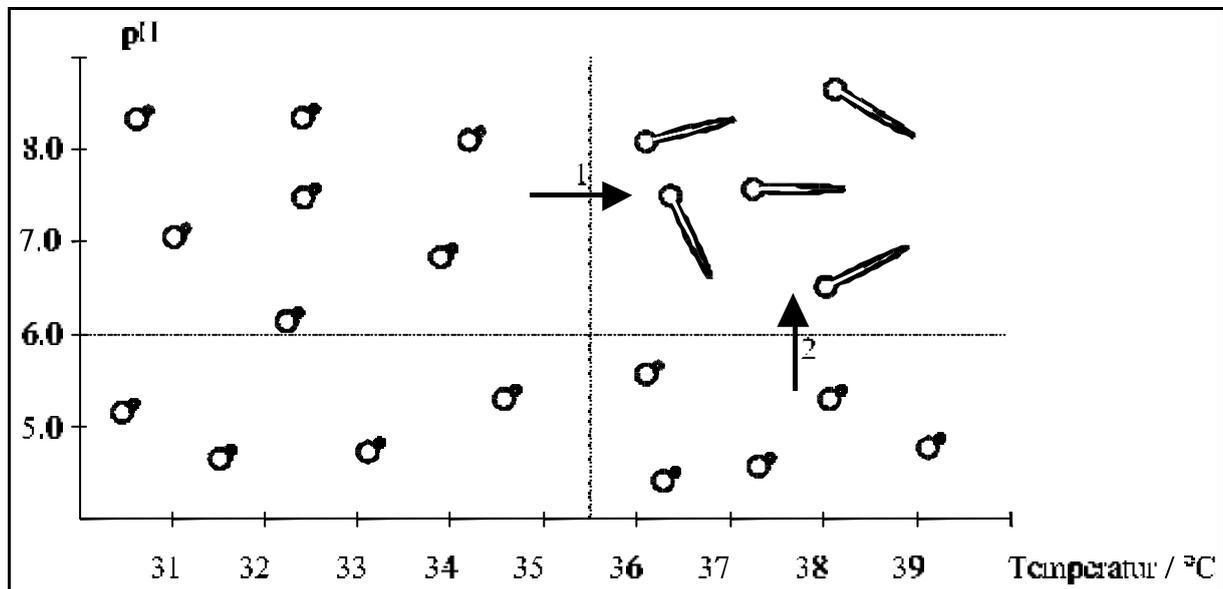


Abb. 3: Physikalische Determinanten des pH-abhängigen Dimorphismus bei *C. albicans*

Eine Temperatur  $> 35,5^{\circ}\text{C}$  (1) und ein pH-Wert von  $> 6,0$  (2) führen zur Induktion filamentösen Wachstums. Unterschreitung einer der beiden Grenzen begünstigt das Wachstum in der Sporenzellform.

Beide Bedingungen finden sich in vielen Wirtsnischen des menschlichen Körpers und es erscheint plausibel, dass eine Adaptation des Pilzes an diese Bedingungen von Vorteil sowohl bei der Kolonisation als auch im Rahmen einer Infektion sein kann.

Ein anderer Pathogenitätsfaktor sind die sezernierten Aspartylproteinasen (SAP's). *C. albicans* besitzt eine Familie von mindestens 10 verschiedenen SAP's, die sehr spezifisch im Laufe einer Infektion reguliert werden (Hube *et al.*, 1994; White und Agabian, 1995; Borg von Zeppelin *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1999). Verschiedene *in vitro* Modelle, aber auch Untersuchungen zur *in vivo* Expression, lassen den Schluss zu, dass diese differentielle Expression essentiell für die Invasion des Wirtsgewebes ist (Schaller *et al.*, 1999 Staib *et al.*, 2000b).

Neben den Aspartylproteinasen sind auch andere enzymatische Aktivitäten von *C. albicans* mit der Pathogenität assoziiert, allen voran die Lipasen und Phospholipasen, die ebenfalls bei der Invasion des Wirtsgewebes eine Rolle spielen und mit zur Virulenz von *C. albicans* beitragen (Ghannoum, 2000, Hube *et al.*, 2000).

Eine Reihe von weiteren Eigenheiten, insbesondere die Fähigkeit zur Adhärenz an Wirtszellen, sind mit der Virulenz von *C. albicans* in Verbindung gebracht worden (Soll *et al.*, 1993; Soll, 1997; Hoyer *et al.*, 1998; Sharkey *et al.*, 1999; Staab *et al.*, 1999). Erst in den letzten Monaten des Entstehens dieser Arbeit ergaben sich Hinweise auf die mögliche Existenz einer sexuellen Fortpflanzungsform bei *C. albicans* (Hull und Johnson, 1999; Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000, Tzung *et al.*, 2001). Inwieweit von dieser Entdeckung unser Verständnis von der Pathogenität dieser Hefe beeinflusst werden wird, ist noch unklar. Lediglich im Analogieschluss, ausgehend beispielsweise von *Cryptococcus neoformans*, bei dem eine Matingform wesentlich virulenter ist, als die andere, können die möglichen Auswirkungen abgeschätzt werden (Kozel, 1995).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Hinblick auf Pathogenitätsfaktoren im Wesentlichen mit der Adaptation von *C. albicans* und *C. dubliniensis* an den pH Wert der Umgebung. Die morphologische Plastizität von *C. albicans* in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung wurde bereits dargestellt. Im Folgenden soll nun auf pH-gesteuert differentiell exprimierte Gene bei *C. albicans* eingegangen werden, die diese Plastizität ermöglichen.

### **1.5. pH-regulierte Gene bei *C. albicans***

Der pH-Wert der Umgebung zählt zu den Umweltbedingungen, die morphogenetische Prozesse in *C. albicans* beeinflussen (Auger *et al.*, 1997; Odds, 1988). Bereits 1984 konnte gezeigt werden, dass ein pH-Wert > 6,0 maßgeblich für die Induktion der Filamentierung ist

(Buffo *et al.*, 1984; Abb. E1). Auch im menschlichen Habitat ist *C. albicans* als Pathogen mit einer ganzen Bandbreite unterschiedlicher pH-Bedingungen konfrontiert, die vom sauren Magensaft über die nahezu neutralen Bedingungen im Blut bis hin zum alkalischen Dünndarmmilieu reichen. Die bisher beschriebenen pH-regulierten Gene von *C. albicans* lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Einerseits finden sich sezernierte Enzyme wie beispielsweise die Aspartylproteinase Sap2. Die pH-regulierte Expression solcher extrazellulär wirkender Pathogenitätsfaktoren ist auch bei Prokaryonten bekannt (Skorupski und Taylor, 1997; Behari und Youngman, 1998). Die zweite Gruppe umfasst zellwandassoziierte Proteine. Die Zellwand fungiert als Barriere zwischen Pilz und Umwelt und muss bei maximaler Rigidität und Stabilität gleichzeitig ein Höchstmaß an morphogenetischer Flexibilität aufweisen (Chaffin *et al.*, 1998; Lipke und Ovalle, 1998; Smits *et al.*, 1999). Es erscheint daher plausibel, dass die Organisation der Zellwand und die an ihr beteiligten Enzyme durch externe Einflussgrößen kontrolliert werden, auch hierfür gibt es Beispiele bei humanpathogenen Bakterien (Carroll *et al.*, 1999).

Sap2 ist eine der bisher 10 beschriebenen sezernierten Aspartylproteinasen von *C. albicans* (Monod *et al.*, 1994 & 1998; Hube, 1996). Deletionsmutanten sind nahezu völlig avirulent in einem vaginalen Infektionsmodell und es ist gezeigt worden, dass Sap2 erheblich zum Epithelschaden in einem *in vitro* Modell der oralen Candidose beiträgt (De Bernardis *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 1999). Die Regulation der Expression von *SAP2* durch den pH-Wert der Umgebung scheint auf indirektem Weg zu erfolgen. Dabei beeinflusst der pH die Aufnahme expressionsstimulierender Spaltprodukte in die Zelle. *SAP2* wird so vor allem im pH-Bereich zwischen 2,5 und 5,5 exprimiert (Hube *et al.*, 1994; White und Agabian, 1995). Die Rolle des pH-Wertes bei der Expression von Sap4-6, die vor allem nach Phagozytose durch Makrophagen erfolgt, ist noch unklar (Borg von Zeppelin *et al.*, 1998)

*PRA1* (pH-reguliertes Antigen 1) wurde mit hyphenspezifischen Antikörpern aus einer cDNA Bank isoliert (Sentandreu *et al.*, 1998). Es ist bei pH 7 maximal exprimiert, unterhalb von pH 6,5 findet sich keine mRNA im Northern Blot. Zusätzlich wird die Expression von *PRA1* durch die Zusammensetzung des Mediums kontrolliert (Sentandreu *et al.*, 1998). *PRA1* zeigt Homologien zur Deuterolysinfamilie von Zink-Metalloproteasen. Die Deletion von *PRA1* resultiert in einer gestörten Keimschlauchbildung und Fehlverteilung von Chitin bei erhöhten Temperaturen (Sentandreu *et al.*, 1998).

*PHR1* und *PHR2* kodieren für zwei funktionell homologe Proteine und sind durch ein invers pH-reguliertes Expressionsmuster gekennzeichnet sind (Mühlschlegel *et al.*, 1998). *PHR1* wird nur unter neutralen und leicht alkalischen Bedingungen exprimiert und ist unterhalb von

pH 5,0 nicht nachweisbar (Saporito-Irwin *et al.*, 1995). Demgegenüber wird *PHR2* unter sauren Bedingungen induziert und im alkalischen Bereich nicht exprimiert (Mühlschlegel und Fonzi, 1997). Beide Gene kodieren für Glycosylphosphatidylinositol verankerte, zellwandassoziierte Proteine. Die Deletion eines der beiden Gene resultiert in einem Virulenzdefekt und Morphogenesestörungen jeweils unter den die Expression stimulierenden pH-Bedingungen (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlschlegel und Fonzi, 1997). Die beeinträchtigte zelluläre Integrität der Deletionsmutanten resultiert aus einer Veränderung der Zellwandstruktur mit fehlenden Verknüpfungen zwischen  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukan. In einer Art Kompensationsmechanismus wird der Chitingehalt der Zellwand erhöht und 40% im Gegensatz zu normalerweise nur 4% der  $\beta$ -1,6-glycosylierten Mannoproteine werden mit Chitin verknüpft (Popolo *et al.*, 1997; Popolo und Vai, 1998; Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000). Die Quervernetzung des Glukangerüsts ist eine essentielle Funktion für die Stabilität aber auch für die Flexibilität der Pilzzellwand (Kollar *et al.*, 1995; Chaffin *et al.*, 1998).

Die pH-regulierte Expression der beiden Gene ist nicht nur ein *in vitro* Effekt. Beide Deletionsmutanten weisen erhebliche pH-abhängige Virulenzdefekte auf (Ghannoum *et al.*, 1995; De Bernardis *et al.*, 1998). Eine  $\Delta$ *phr1* Mutante ist nicht in der Lage, eine systemische Infektion im Mausmodell zu verursachen, während sie bei vaginaler Instillation eine Vaginitis ähnlich dem Verlauf beim Wildtyp hervorruft. Die gegenteilige Konstellation findet sich bei der  $\Delta$ *phr2* Mutante. Die hier getesteten *in vivo* Bedingungen reflektieren die beschriebene *in vitro* Situation. Der pH von Blut liegt bei 7,4, während der vaginale pH mit 4,0 im sauren Bereich liegt (De Bernardis *et al.*, 1998).

PHR homologe Gene sind bei einer Reihe von Pilzen beschrieben worden. Unter anderem finden sich solche Gene in *Candida maltosa*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus fumigatus* (Vai *et al.*, 1991; Nakazawa *et al.*, 1998; Mouyna *et al.*, 2000; Weig *et al.*, 2001). *C. albicans* ist jedoch die einzige Spezies für die ein balanziertes pH-gesteuertes Regulationssystem gezeigt werden konnte. Lediglich in *C. maltosa* scheint es eine zumindest ähnliche Regulation dieser Gene zu geben (Nakazawa *et al.*, 1998; Nakazawa *et al.*, 2000).

### **I.6. Regulation pH-abhängiger Genexpression bei *C. albicans***

Über die Regulation der pH-abhängigen Genexpression bei *C. albicans* war lange Zeit nichts bekannt. Entscheidend für die Entdeckung zentraler Elemente der *C. albicans* pH-Antwort waren die Kenntnisse über eine ähnliche Kaskade bei *Aspergillus nidulans*. Der saprophytäre

Ascomycet *A. nidulans* zeigt eine Reihe von Phänotypen in Abhängigkeit vom pH-Milieu der Umgebung und exprimiert etliche extrazelluläre Enzyme in einem pH-abhängigen Muster (Caddick *et al.*, 1986; Espeso *et al.*, 1993; Tilburn *et al.*, 1995; MacCabe *et al.*, 1998). Durch die Analyse von Mutanten, bei denen diese Eigenschaften nicht länger pH-reguliert waren, gelang die Charakterisierung von Bestandteilen einer pH-responsiven Kaskade in *A. nidulans*, die für *C. albicans* und andere Spezies Modellcharakter besitzt (Caddick *et al.*, 1986; Arst *et al.*, 1994; Denison *et al.*, 1995; Orejas *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1996; Espeso *et al.*, 1997; Mingot *et al.*, 1999; Negrete-Urtasun *et al.*, 1999). Im Zentrum dieser Kaskade steht der Transkriptionsfaktor PacC, ein Mitglied der Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Klasse von Zinkfingerproteinen. PacC wird bei neutralen und alkalischen Bedingungen durch Abspaltung einer C-terminal inhibierenden Domäne aktiviert und kann dann an die Konsensussequenz GCCARG im Promotorbereich PacC abhängig exprimierter Gene binden (Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1996; Espeso *et al.*, 1997; Maccheroni Jr. *et al.*, 1997; Mingot *et al.*, 1999). Pal A, B, C, F, H und I bilden eine Kaskade von Faktoren, deren Anwesenheit für die Aktivierung von PacC notwendig ist. Verschiedene Homologe bei anderen Spezies sind bekannt; die genauen Funktionen der einzelnen Glieder sowie ihre Interaktionen untereinander sind allerdings noch unklar (Su und Mitchell, 1993; Arst *et al.*, 1994; Denison *et al.*, 1995; Li und Mitchell, 1997; Negrete Urtasun *et al.*, 1997; Denison *et al.*, 1998; Negrete Urtasun *et al.*, 1999; Treton *et al.*, 1999).

Durch die Suche nach Sequenzen im Genom von *C. albicans*, die Homologien zu Bestandteilen der *A. nidulans* Kaskade aufweisen, gelang die Isolierung von Faktoren, die in *C. albicans* für die Regulation pH-abhängiger Prozesse verantwortlich sind. Zentraler Bestandteil dieser Kaskade in *C. albicans* ist der PacC-homologe Transkriptionsfaktor *RIM101* (früher auch *PRR2*) (Ramon *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000a und b; El Barkani *et al.*, 2000b). Die Anwesenheit dieses Faktors, wie auch des vorgeschalteten *PRR1*, ist notwendig für das beschriebene pH-abhängige Expressionsmuster von *PHR1* und *PHR2*. Durch Trunkierung des *RIM101* Gens können dominant aktive Allele entstehen. Dies führt zu einer Entkopplung des pH-abhängigen Dimorphismus aus seinen natürlichen Grenzen (El Barkani *et al.*, 2000b). Verschiedene Pal homologe Gene, die ebenfalls in die pH-Antwort bei *C. albicans* eingebunden sind und mutmaßlich die Aktivierung von *RIM101* ermöglichen, wurden beschrieben (Porta *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000b). Die pH-sensitive Signaltransduktionskaskade ist von entscheidender Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000b).

## **I.7. Infektionen durch *Candida***

Die morphologischen Erscheinungsbilder von durch *Candida sp.* hervorgerufenen Erkrankungen sind variabel und in Abhängigkeit vom immunologischen Zustand des betroffenen Patienten sehr unterschiedlich im Schweregrad (Mims *et al.*, 1998; Odds, 1988; Engelmann, 1999). Obwohl *C. albicans* der bei Weitem am häufigsten isolierte Erreger ist, können alle im Folgenden genannten Infektionen auch von non-*albicans* Spezies ausgelöst werden (Fridkin und Jarvis, 1996). Grundsätzlich zu unterscheiden von einer Infektion durch diese fakultativ pathogene Hefe ist die Kolonisation des gesunden Menschen. *C. albicans* ist ein normaler Bestandteil der humanen oralen und intestinalen Flora und kann bei der Mehrzahl aller Gesunden im Stuhl nachgewiesen werden. Ausgehend von diesen kolonisierten Körperstellen kann es jedoch bei einer Veränderung der Immunsituation zu einer endogenen Infektion kommen (Kappstein *et al.*, 1998). Beispiele für solche Veränderungen können lokalisierte Schwächungen der Immunabwehr, wie bei topischer Anwendung von Glukocortikoiden (z.B. Inhalationspräparate) oder auch globale Schwächungen wie AIDS, maligne Tumoren oder ein unzureichend eingestellter Diabetes mellitus sein. Auch Veränderungen der bakteriellen Normalflora durch antibiotische Therapie können zu einer Infektion durch *C. albicans* führen (Kappstein *et al.*, 1998).

Das schwerwiegendste durch *Candida* ausgelöste Krankheitsbild ist die Sepsis mit disseminiertem Organbefall, eine vitale Bedrohung für die meist ohnehin schwerkranken Patienten (Odds, 1988; Kappstein *et al.*, 1998; Engelmann, 1999). Die Inzidenz von *Candida*-Septitiden nimmt zu, *C. albicans* ist mittlerweile der vierthäufigste Sepsiserreger. Zu Recht ist diese schwerwiegende Infektion wegen ihrer hohen Letalität und wirtschaftlichen Auswirkungen gefürchtet (Jarvis, 1995; Wenzel, 1995; Pfaller *et al.*, 1998; Rentz *et al.*, 1998).

Die bekannteste Erkrankung durch *C. albicans* ist die orale Candidose (Mundsoor). Typischerweise finden sich weiße, schwer abwischbare Beläge auf der gesamten Mundschleimhaut, die Patienten klagen über Brennen und Schmerzen insbesondere bei der Nahrungsaufnahme. Neben dieser pseudomembranösen Form finden sich auch untypische Morphologien wie ein atrophisch-erythematöser Verlauf oder eine anguläre Cheilitis (Odds *et al.*, 1988). Meist lässt sich die Überwucherung der Mundhöhle gut mit lokalen Antimykotika-Applikationen therapieren. Problematisch dagegen ist die orale Candidose bei immunkompromittierten Patienten und hier insbesondere bei HIV Infizierten. Durch die Schwächung der T-Zell vermittelten Immunabwehr kommt es häufig zu therapierefraktären, prolongierten Ver-

laufsformen, die sich auch aboral im Gastrointestinaltrakt ausbreiten und den gesamten Ösophagus und sogar den Magen befallen können (Kappstein *et al.*, 1998). Die durch *Candida* verursachte Ösophagitis wird daher zu den AIDS definierenden Erkrankungen gezählt, sie verläuft häufig asymptomatisch und muss nicht mit einem Befall der Mundhöhle einhergehen (Trier und Bjorkman, 1984; Young und Elias, 1985). Zur Vermeidung solcher schwerwiegenden Verlaufsformen wird mittlerweile generell eine Prophylaxe mit Fluconazol empfohlen (Lorthloray und Dupont, 1997). Die oropharyngeale Candidose bei HIV-infizierten Patienten wird in bis zu 30% der Fälle von *C. dubliniensis* ausgelöst (Meiller *et al.*, 1999, diese Arbeit). In keinem anderen anatomischen Habitat findet sich diese Spezies so häufig und auch bei HIV-negativen Patienten sind *C. dubliniensis* Isolate selten beschrieben worden. Die Gründe für diese weitgehende Spezialisierung von *C. dubliniensis* sind bis dato unklar.

Eine andere sehr häufige Erkrankung, die durch *Candida* ausgelöst wird, ist die Vulvovaginitis. Wie im oropharyngealen Habitat ist *Candida* auch in der vaginalen Flora physiologischerweise (in 10-30%) zu finden. Unter noch ungeklärten Umständen kann es auch hier zu einer plötzlichen Zunahme der Hefe kommen, die dann in einer Vulvovaginitis, die sich typischerweise mit Brennen, Juckreiz und weißlichem Fluor, in dem der Erreger einfach nachzuweisen ist, resultiert (Odds, 1988; Engelmann, 1999). In letzter Zeit sind vermehrt Fälle von vulvovaginalen Candidosen durch *C. glabrata* beschrieben worden, die schlechter auf Azole ansprechen und häufig rezidivieren (Sobel, 1999). Vulvovaginale Candidosen werden durch die hormonellen Gegebenheiten während einer Schwangerschaft häufig verstärkt. Hieraus ergibt sich das Problem der möglichen intrapartalen Übertragung auf das Neugeborene (Blaschke-Hellmessen, 1998). Insbesondere frühgeborene Kinder sind gefährdet. Durch ein unreifes Immunsystem nur unzureichend bekämpft, kann die Infektion mit *Candida* bei diesen Patienten zu schweren Organmanifestationen (z.B. Meningitis) oder Sepsis vom late-onset Typ führen, die dann oft letal verlaufen (Odds, 1988; Engelmann, 1999).

Bei Säuglingen besteht auch das Problem der Windeldermatitis. „Windeeffekte“ wie Okklusion mit Mazeration der Haut und Retention von Stuhl und Urin führen bei unzureichender Pflege, aber auch bei übertriebener Reinigung und Anwendung von Salben, zu einer Schädigung der Haut im Sinne einer Dermatitis. Auf dieser vorgeschädigten Fläche kann es sekundär zu einer Ansiedlung von *Candida*, vorzugsweise aus dem Stuhl, kommen (Odds, 1988; Engelmann, 1999).

Auch beim Erwachsenen sind dermale Candidosen bekannt. Prädilektionsstellen sind intertriginale und interdigitale Räume. Neben den oben bereits genannten prädisponierenden Faktoren können bei der Entstehung der Candidose auch übermäßige Reinigung oder Hyperhidrose

eine Rolle spielen. Das für *Candida* typische Bild der weißlichen, schwer abstreifbaren Beläge kann gänzlich fehlen und eine erosiv-erythematöse Entzündung vorherrschen.

Viele andere Organe können, insbesondere auch im Rahmen einer generalisierten Infektion, von *Candida* befallen werden. Als Beispiele seien Endophthalmitis, Peritonitis und Pneumonie genannt (Kappstein *et al.*, 1998).

### **I.8. Therapie von Infektionen durch *Candida* und Resistenzproblematik**

Für fast 30 Jahre, von den 50er Jahren bis zur Entdeckung der Azole, war Amphotericin B die einzige verfügbare Therapie für schwere Pilzinfektionen (Ghannoum und Rice, 1999). Diese Substanz wird aus *Streptomyces nodosa* (phylum *Actinobacteria*) gewonnen und zählt zur Gruppe der Polyenantimykotika. Amphotericin B ist das zur Zeit einzige Polyen, das auch systemisch eingesetzt werden kann. Demgegenüber eignen sich Nystatin und Natamycin nur zur lokalen Therapie (Mutschler, 1996). Alle Organismen, die suszeptibel für diese Antimykotika sind, dazu zählen Hefen, Algen und einige Protozoen wie Leishmanien, enthalten Sterole in ihren äußeren Zellmembranen. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Supplementation des Mediums mit Sterolen zu Resistenz gegen Amphotericin B führt (Ghannoum und Rice, 1999). Der Hauptwirkungsmechanismus von Amphotericin B ist die direkte Interaktion dieses großen Moleküls mit den Sterolkomponenten der Membran. Diese führt zur Ausbildung von Poren aus acht Amphotericin B Molekülen, die über hydrophobe Wechselwirkungen in der Membran verankert sind. Die resultierende Permeabilitätsveränderung führt zum Verlust essentieller intrazellulärer Komponenten sowie des Protonengleichgewichtes und daran gekoppelter Transportmechanismen und letztendlich zum Zelltod. Sekundäre Mechanismen könnten durch Polyene verursachte oxidative Zellschädigungen oder über Fettsäurekomponenten vermittelte Wechselwirkungen darstellen (Ghannoum und Rice, 1999). Trotz mehr als 30 Jahren klinischer Anwendung sind Resistenzen gegen Amphotericin B oder Nystatin eine Rarität. Ein Mechanismus für die Resistenzentwicklung geht mit einem Absinken des Ergosterolgehaltes der Zellmembran einher. Auch Veränderungen in der biochemischen Struktur der Sterole können ausschlaggebend für reduzierte Suszeptibilität sein. Studien an Polyen-resistenten Mutanten der apathogenen Bäckerhefe legen nahe, dass zumindest vier verschiedene Gene in die Resistenzentwicklung eingebunden sein können (White *et al.*, 1998; Ghannoum und Rice, 1999). Nur einige wenige Spezies, die in seltenen Fällen als Erreger isoliert werden, sind gegen Amphotericin B grundsätzlich resistent. Genannt werden sollen hier *Candida lusitaniae* und *Pseudallescheria boydii* (Martins und Rex, 1996). Trotz

dieser günstigen Voraussetzungen ist der Gebrauch von Polyenen stark eingeschränkt, weil sie zu gravierenden unerwünschten Wirkungen führen. Diese können sich aus der Interaktion mit Cholesterin in der Membran humaner Zellen erklären und reichen von Fieber, Schüttelfrost, Thrombophlebitis und Leberschäden bis hin zur schwerwiegenden Nephrotoxizität (Cheng *et al.*, 1982; Gallis *et al.*, 1990; Wingard *et al.*, 1999). Aus diesem Grund darf Amphotericin B nur unter klinischer Überwachung verabreicht werden. Zwar sind heute liposomale Zubereitungen klinisch verfügbar (Ambisome<sup>R</sup>), die weniger unerwünschte Wirkungen verursachen, diese sind jedoch um ein Vielfaches teurer als die herkömmlichen Präparate (Prentice *et al.*, 1997; Leenders *et al.*, 1998; Wiebe *et al.*, 1998; Ghannoum und Rice, 1999; Walsh *et al.*, 1999).

Aus diesen Gründen war die Einführung der Azole ein bedeutender Fortschritt in der Therapie von Pilzinfektionen. Diese Substanzen behindern die Ergosterolsynthese durch Interaktion mit der Hämgruppe der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase. Dadurch kommt es zur Akkumulation von Ergosterolvorläufern und nachfolgend zu einer Veränderung der Zellmembranzusammensetzung. Des Weiteren haben einige Azole eine ganze Reihe von anderen Wirkungen wie die Hemmung der Lipidbiosynthese und die Inhibition verschiedener membranständiger Enzyme (u.a. Chitinsynthetase), die zur antimykotischen Wirkung beitragen (Ghannoum und Rice, 1999). Azole können lokal wie systemisch angewendet werden und sind im allgemeinen sehr gut verträglich. Im Vordergrund bei den unerwünschten Wirkungen stehen gastrointestinale Beschwerden, Müdigkeit und Kopfschmerzen, nur sehr selten kann es zu dann jedoch schwerwiegenden Leberschädigungen kommen. Fluconazol, das bekannteste Azolpräparat, wurde seit seiner Einführung an über 16 Millionen Patienten verabreicht. Mit diesem weit verbreiteten Gebrauch einher geht jedoch eine zunehmende Resistenzproblematik (White *et al.*, 1998; Ghannoum und Rice, 1999). Vier Hauptmechanismen sind hierfür verantwortlich. Veränderungen in der Lanosteroldemethylase oder Überexpression des codierenden Genes führen ebenso zu Resistenz wie die Expression von Effluxpumpen und sekundäre Veränderungen in der Sterolbiosynthese (Vanden Bossche *et al.*, 1983; Prasad *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1996; White *et al.*, 1998). Zusätzlich sind einige Spezies des Genus *Candida* wie *C. glabrata* und *C. krusei* bereits intrinsisch weniger sensibel oder gar resistent gegen Azole (White *et al.*, 1995; Ghannoum und Rice, 1999). Neuartige Azole, die eine erhöhte Wirksamkeit auch bei solchen Stämmen aufweisen, befinden sich zur Zeit in der klinischen Erprobung (Sheehan *et al.*, 1999)

Eine dritte wichtige Gruppe von Antimykotika sind die Allylamine und deren Hauptvertreter Terbinafin. Auch diese Medikamente greifen in die Sterolbiosynthese ein, allerdings auf einer

früheren Stufe als die Azole (Hemmung der Squalenepoxidase). Trotz eines weiten *in vitro* Spektrums ist Terbinafin *in vivo* hauptsächlich gegen Dermatophyten wirksam. Die Verträglichkeit ist im allgemeinen gut, Resistenzentwicklungen sind bis dato nicht bekannt (Ghannoum und Rice, 1999).

5-Fluorocytosin ist ein fluoriertes Pyrimidin mit antimykotischer Wirkung. Dieser Wirkstoff interferiert mit Nukleinsäure- und Proteinsynthese. Wegen der hohen Rate an Resistenzen wird 5-Fluorocytosin heute nur noch in Kombination mit Amphotericin B oder Azolen gegeben (Ghannoum und Rice, 1999).

Das verfügbare Spektrum an Antimykotika ist auf wenige Substanzgruppen beschränkt und kann nicht mit der Vielzahl an erhältlichen Antibiotika verglichen werden. Neue Substanzen mit neuen Wirkmechanismen und guter klinischer Verträglichkeit sind daher dringend erforderlich. Eine Reihe von neuen Antimykotika befinden sich in verschiedenen Stufen der klinischen Erprobung. Dazu zählen neben neuen Azolen vor allem die Echinocandine. Letztere wirken durch Hemmung der Glukanbiosynthese und stören so den Aufbau der Zellwand (Georgopapadakou und Tkacz, 1995).

### **I.9. Hypothesen und Ziele der Arbeit**

Die streng pH-regulierte Expression GAS homologer Gene ist bisher nur für *C. albicans* beschrieben, obgleich man solche Gene in vielen Spezies gefunden hat. Aufgrund der Tatsache, dass selektive Deletion der GAS-Homologen *PHR1* und *PHR2* in *C. albicans* auch *in vivo* zu einem pH-abhängig virulenzdefizienten Phänotyp führt, stellt sich die Frage, ob die pH-regulierte Expression Zeichen einer optimalen Adaptation an den menschlichen Wirt ist. Sollte dies der Fall sein, so ist es von größtem Interesse, zu wissen, ob dieses Phänomen ein spezifisches Merkmal von *C. albicans* darstellt oder auch in einer nahe verwandten, aber mutmaßlich weniger pathogenen Spezies wie *C. dubliniensis* zu finden ist. Gegenstand dieser Arbeit ist:

- I) der Nachweis und die molekulare wie funktionelle Charakterisierung PHR homologer Gene bei *C. dubliniensis*;
- II) die Analyse von Unterschieden zwischen diesen Genen und ihren *C. albicans* Homologen im Hinblick auf Sequenz, Organisation und transkriptionelle Regulation;

- III) die Verwendung dieser Gene als Sensoren für die Funktionalität der pH-regulativen Kaskade in *C. albicans* und *C. dubliniensis* und der Vergleich der molekularen Steuerung pH-abhängiger Effekte in beiden Spezies;
- IV) die Ausnutzung von Sequenzunterschieden zwischen *PHR1* und seinem *C. dubliniensis* Homolog für die Entwicklung eines schnellen molekularen Tests zur Speziesdifferenzierung;
- V) eine retrospektive Studie zur Prävalenz von *C. dubliniensis* in einem Kollektiv chlamydosporenpositiver und daher im klinischen Routinevorgang als *C. albicans* klassifizierter Isolate;
- VI) die Evaluierung verschiedener phänotypischer Differenzierungsverfahren zur Identifikation von *C. dubliniensis* und die Untersuchung der Frage nach dem Zusammenhang zwischen Azolresistenz und dem Aufkommen von *C. dubliniensis*.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1. Geräte

Brutschränke	Heraeus Typ B 6200, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammern	Agagel Maxi, Biometra, Göttingen, Deutschland DNA Subcell, Biorad, München, Deutschland
Elektroporationsgeräte	GenePulser, BioRad, München Pulse Controller, BioRad, München
Gel Dokumentationssystem	MidiDoc, Herolab, Wiesloch, Deutschland
Heizblöcke	Typ 2099/DA Liebisch Heizblock, Heinse & Ziller, Würzburg, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Hybaid, Biometra, Göttingen, Deutschland
Kühlgeräte	Kühlschrank (4°C) Kühltruhe (-20°C) Kühltruhe (-80°C)
Mikroskope	Leitz DMRB, Leica, Bensheim, Deutschland Leica DMLB, Leica, Bensheim, Deutschland (Photographiemikroskop) Aristoplan, Leica, Bensheim, Deutschland
Mikroskopkamera	Olympus DP10
Netzgeräte	Consort E 431, Kreuz, Reiskirchen, Deutschland Power Supply 200/2.0, Biorad, München, Deutschland
pH-Meter	Digitales Labor-pH-meter, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Röntgenkassette	Kodak X-O-matic, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Schüttelinkubatoren	Gyrotory Waterbath Shaker G24 und G76, New Brunswick Scientific, Edison, USA
Shaker	Diffusionsentfärbearparatur, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Spektrophotometer	U-2000, Hitachi, San Jose, USA
Sterilbank	Cleanbench Gelaire BSB 4A, Mailand, Italien
Thermocycler	T3, Biometra, Göttingen, Deutschland

UV-Crosslinker	Stratalinker 1800, Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuumtrockner	Speed Vac Plus, SC110A, Savant, New York, USA
Vortex	GLW M35, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Waagen	Sartorius Portable, Heinse & Ziller, Würzburg, Deutschland
Zentrifugen	EBA-12, Hettich, Tuttlingen, Deutschland Typ 1306, Hettich, Tuttlingen, Deutschland Biofuge Pico. Heraeus, Hanau, Deutschland RC-5b Sorvall, Heraeus, Hanau, Deutschland

## II.2. Bezugsfirmen

Chemikalien und Hilfsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion, Austin, USA

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

AppliChem, Darmstadt

Becton Dickinson, Heidelberg

Difco Laboratories, Augsburg

Eurogentec, Seraing, Belgien

Gibco, Paisley, Großbritannien

ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA

Merck, Darmstadt

New England Biolabs, Schwalbach

Peq-lab, Erlangen

Perkin-Elmer, Weiterstadt

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma, München

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

## II.3. Verbrauchsmaterialien

Hybond Nylonmembran, Amersham International, Braunschweig, Deutschland

Whatman Papier, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland

Röntgenfilme (Hyperfilm MP), Amersham International, Braunschweig, Deutschland

Elektroporationsküvetten, Eurogentec, Seraing, Belgien

Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Nuclease-freie Microfuge-Caps, Ambion, Austin, Texas, USA

15 ml Röhrchen steril, Greiner, Nürtingen, Deutschland

50 ml Röhrchen (Falcon) steril, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Bakterienfilter, Nalgene, Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Weiterhin wurden Objektträger, Deckgläschen, Petrischalen und wiederverwertbare Gefäße verwendet, wie sie von jedem Laborausstatter zu beziehen sind.

#### **II.4. Kits**

QIAprep Spin MINIprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAprep Spin MIDIPrep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

Qiagen PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

GeneClean II, Bio 101, Vista, California, USA

Stratagene PrimeIt Labeling Kit, Stratagene, Amsterdam, Niederlande

TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande

#### **II.5. Kulturbedingungen**

Soweit nicht anders angegeben, wurden Pilze bei 30 C auf YPD oder Sabouraud Agar gezüchtet, Bakterien bei 37 C auf LB Agar. Aufbewahrung der Kulturen erfolgte unter Austrocknungsschutz bei 4 C.

##### **II.5.1. Nährmedien**

**CHROMagar Candida**

10 g/l Pepton

20 g/l Glucose

15 g/l Agar

(ff. nächste Seite)

0,5 g/l Chloramphenicol

<b>Fortsetzung CHROMagar Candida</b>	2 g/l chromogene Substanz Die fertigen Agarplatten wurden von Becton-Dickinson zur Verfügung gestellt. Der Hersteller macht keine Angaben bezüglich der Zusammensetzung der chromogenen Substanz.
<b>LB Medium</b> (Luria-Bertani-Medium)	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl
<b>M199 Medium</b>	9,8g M199 Grundlage (Gibco) 35,7g HEPES-Puffer ad 1l H <sub>2</sub> O pH einstellen und sterilfiltrieren.
<b>Rice Tween</b>	15g Reisextrakt Agar (Merck) 10ml Tween 80 (Merck) ad 1l H <sub>2</sub> O pH mit NaOH auf 7,0 einstellen
<b>Sabouraud</b>	16g Agar Agar 40g Glucose 10g Bacto Pepton ad 1l H <sub>2</sub> O pH 5,6 einstellen nach dem Autoklavieren mit 12,3mg Penicillin und 48mg Streptomycin supplementieren
<b>SOC Medium</b>	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10mM MgSO <sub>4</sub>

<b>STAIB- Agar</b> ( <i>Guizotia abyssinica</i> Agar) (Staib <i>et al.</i> , 1987)	50g Samen von <i>Guizotia abyssinica</i> 1g Glucose 1g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g Kreatinin 15g Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O, autoklavieren supplementieren mit Penicillin (12,32mg) und Streptomycin (40mg)
<b>YNB (yeast nitrogen base)</b>	YNB Grundlage (Difco) nach den Angaben des Herstellers verwenden.
<b>YNB mit pH Einstellung</b>	(für 1l) 20g Glucose 5g Ammoniumsulfat 35,7g HEPES-Puffer 1,7g YNB-Grundlage ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH einstellen und sterilfiltrieren.
<b>YPD (yeast-peptone-dextrose)</b> (Sherman <i>et al.</i> , 1986)	2% Glucose 2% Pepton 2% Hefeextrakt
<b>YPD mit pH Einstellung</b>	(für 1 l) 20g Pepton und 10g Hefeextrakt in 200ml H <sub>2</sub> O autoklavieren. 20g Glucose und 35,7g HEPES-Puffer in 800 ml H <sub>2</sub> O auflösen, gewünschten pH-Wert einstellen und sterilfiltrieren. Beide Teile zusammengeben.

Alle flüssigen Nährmedien können durch Zugabe von 15 g Agar auf 1 l Medium (vor dem Autoklavieren) verfestigt werden.

### II.5.2. Supplemente und Selektionsverfahren

#### Auxotrophie - Supplemente (Pilze)

<i>C. albicans</i>	$\Delta$ <i>ura3</i>	Uridin 25µg/ml
<i>C. glabrata</i>	$\Delta$ <i>ura3</i>	Uracil 20µg/ml
	$\Delta$ <i>trp1</i>	Tryptophan 40µg/ml
	$\Delta$ <i>his3</i>	Histidin 40µg/ml
<i>S. cerevisiae</i>	<b>Dade2</b>	Adenin 40µg/ml
	$\Delta$ <i>ura3</i> , $\Delta$ <i>trp1</i> , $\Delta$ <i>his3</i>	wie bei <i>C. glabrata</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>lysF88</i>	Lysin (1mM Endkonzentration)
	<i>pabaA1</i>	p-Aminobenzoesäure 15µg/ml

Transformanten wurden durch Komplementation einer vorbestehenden Auxotrophie selektioniert.

#### Selektion auf Ampicillinresistenz (*E. coli*)

<i>E. coli</i>	<i>Amp<sup>r</sup></i>	Ampicillin 100 µg/ml
----------------	------------------------	----------------------

### II.5.3 Stammsammlungskulturen

Kulturen für die Stammsammlung wurden über Nacht in einem Vollmedium (Pilze: YPD, Bakterien: LB) angezüchtet und mit 25% Glycerin supplementiert (Zugabe der gleichen Menge an 50 % Glycerin). Die Aufbewahrung erfolgte bei –80°C.

### II.6. Gebrauchslösungen

Ammoniumacetat	NH <sub>4</sub> Ac, dient der Fällung von PCR Produkten zur direkten Sequenzierung. Stocklösung 4 M, pH 4,6.
----------------	--

Blaumarker DNA	0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol, 0,1% SDS, 0,025 M EDTA pH 8,0 in Glycerin.
Blaumarker RNA	20% Ficoll/Orange G in DEPC H <sub>2</sub> O
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH in H <sub>2</sub> O.
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat, dient der Eliminierung von RNAsen bei Präparation von RNA. 1 ml DEPC wird über Nacht unter Lichtschutz in 1 l H <sub>2</sub> O verrührt, das Wasser wird danach zur Inaktivierung von DEPC autoklaviert.
dNTP	Äquimolare Mischung aus allen vier Deoxynucleotidbausteinen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Stratagene). Stocklösung in sterilem H <sub>2</sub> O nach Angaben des Herstellers
DTT	Dithiothreitol, dient dem Aufbrechen von Thio-schwefelbrücken (Sigma). Stocklösung 1 M in Wasser.
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat, Stocklösung 0,5 M pH 8,0 (autoklavieren)
Glycerin (100%)	Stock (Glycerin 100%) Stocklösung 50% sterilfiltriert.
Hybridisierungswaschpuffer	2x SSC, 0,1% SDS in H <sub>2</sub> O.
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat. Stocklösung 1 M in H <sub>2</sub> O pH 7,5 (sterilfiltrieren)
Lithiumacetat 10x	Stocklösung 1 M in H <sub>2</sub> O, pH 7,5.
Monod Puffer	7% SDS, 0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1mM EDTA in H <sub>2</sub> O.
MOPS 10x	200 mM MOPS ([3-N-morpholino]propansulfonsäure, Sigma), 1,9g EDTA, 8,3 ml Natriumacetat, ad 500 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O.
Natriumacetat	Na-Ac., Stocklösung 3 M pH 5,2 mit Essigsäure einstellen.
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 1 M Tris in H <sub>2</sub> O, pH 8,0.
PEG-4000	50% Polyethylenglycol 4000 in H <sub>2</sub> O.
PEG-8000	50% Polyethylenglycol 8000 in H <sub>2</sub> O.

SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat, Detergens. Stocklösung 20% in H <sub>2</sub> O.
Sorbitol	Stocklösung 2 M in H <sub>2</sub> O (sterilfiltrieren)
SSC 20x	3 M NaCl, 0,5 M Na-citrat in H <sub>2</sub> O, pH 7,0.
TAE 50x	2 M Tris, 0,1 M EDTA, 5,71 Vol% Eisessig in H <sub>2</sub> O.
TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O
TES	400 µl 100mM Tris-HCl (pH 7,5) in DEPC-H <sub>2</sub> O 80 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) in DEPC-H <sub>2</sub> O 100 µl 20% SDS in DEPC-H <sub>2</sub> O ad 4 ml DEPC-H <sub>2</sub> O
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid, dient dem Nachweis von β-Galactosidase Aktivität (lacZ Selektion in <i>E. coli</i> ). Stocklösung 40 mg/ml in Dimethylformamid.

## **II.7. Sterilisationsverfahren**

Autoklavieren: im Regelfall bei 121°C für 20 min.

Sterilfiltration: für hitzeempfindliche Lösungen, die nicht autoklaviert werden können, wurde eine Filtration unter Vakuumsog durch bakterien-dichte Filter (Porengröße 0,2 µm) durchgeführt.

## **II.8. Hard- und Software**

### **II.8.1. Hardware**

Rechner: Intel Pentium III – 700Mhz (Network)  
Power Macintosh (8200/120) (Apple)

Scanner: Agfa Snapscan 1212 USB

Drucker: Brother HL-820 Laser

## II.8.2 Software

Adobe Photoshop 3.0.5; Adobe Systems Inc. (Photodokumentation)

Lasergene (DNASTar, Madison, USA) (Sequenzanalysen)

Microsoft Word 7.0, Word 2000; Microsoft Inc. (Textverarbeitung)

Microsoft Powerpoint (1998); Microsoft Inc. (Graphik)

Olympus DP-Software (Digitalkamera Photomikroskop)

Sequence Navigator 1.0.1; Perkin Elmer (Sequenzanalysen)

## II.8.3 Internetressourcen

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), die Homepage des National Center for Biotechnology Information mit Links zu GenBank und online Blast.

[www.journals.asm.org](http://www.journals.asm.org) mit Onlineversionen aller ASM (American Society for Microbiology) Publikationen.

Zahlreiche andere Journals stehen in mehr oder weniger frei verfügbaren Online-Versionen zur Verfügung. Einen guten Überblick bietet hier eine Service Page der Universitätsbibliothek Regensburg (über [www.uni-regensburg.de](http://www.uni-regensburg.de))

[www.pubcrawler.ie](http://www.pubcrawler.ie) als automatische Suchmaschine für relevante neue Publikationen, die Ergebnisse werden wöchentlich an die eigene email gesendet.

[genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/](http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/) mit Zugriff auf das kompletten Genom von *S. cerevisiae*.

[www.sanger.ac.uk/project/C-albicans/](http://www.sanger.ac.uk/project/C-albicans/), [sequence-www.stanford.edu/group/Candida](http://sequence-www.stanford.edu/group/Candida), die Homepages des *C. albicans* Genomprojekts.

Literaturrecherche erfolgte mit Medline und Current Contents über den Server der Universität Würzburg.

## II.9. Stämme in dieser Studie

### II.9.1 Pilze

#### *II.9.1.1 Referenzstämme*

Referenzstammsammlungen:

CBS            Centralbureau voor Schimmelcultures  
 Uppsalalaan 8  
 3584 CT Utrecht / Niederlande  
[www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)

ATCC           American Type Culture Collection  
 10801 University Boulevard  
 Manassas VA 20110-2209 / USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

<b>Stamm</b>	<b>Spezies</b>	<b>Herkunft</b>
SC 5314	<i>C. albicans</i>	Gillum <i>et al.</i> , 1984
132A	<i>C. albicans</i>	Gallagher <i>et al.</i> , 1992
3153	<i>C. albicans</i>	Odds, 1974
CA019	<i>C. albicans</i>	Kurzai <i>et al.</i> , 1999
CA024	<i>C. albicans</i>	Kurzai <i>et al.</i> , 1999
ATCC 11006	<i>C. stellatoidea</i>	American Type Culture Collection
ATCC 20408	<i>C. stellatoidea</i>	American Type Culture Collection
CBS 7987	<i>C. dubliniensis</i>	Centralbureau voor Schimmelcultures
CBS 7988	<i>C. dubliniensis</i>	Centralbureau voor Schimmelcultures
NCPF 3949	<i>C. dubliniensis</i>	= CBS7987
CD33	<i>C. dubliniensis</i>	Sullivan <i>et al.</i> , 1995
CD38	<i>C. dubliniensis</i>	Sullivan <i>et al.</i> , 1995
CM1	<i>C. dubliniensis</i>	Sullivan <i>et al.</i> , 1995
LP	<i>C. dubliniensis</i>	Kurzai <i>et al.</i> , 1999
ATCC 90876	<i>C. glabrata</i>	American Type Culture Collection

CBS 94	<i>C. tropicalis</i>	Centralebureau voor Schimmelcultures
CBS 604	<i>C. parapsilosis</i>	Centralebureau voor Schimmelcultures
CBS 673	<i>Issatchenkia orientalis</i> (= <i>C. krusei</i> )	Centralebureau voor Schimmelcultures
CBS 566	<i>Pichia guilliermondii</i> (= <i>C. guilliermondii</i> )	Centralebureau voor Schimmelcultures
CBS 834	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (= <i>C. kefyri</i> )	Centralebureau voor Schimmelcultures
CBS 5611	<i>C. maltosa</i>	Centralebureau voor Schimmelcultures

Referenzstämme, die als Kontrollen bei den Resistenztestungen im epidemiologischen Teil dieser Arbeit mitgeführt wurden, sind im Abschnitt Resistenztestungen aufgeführt.

#### II.9.1.2 Gentechnisch modifizierte Stämme

<b>Stamm</b>	<b>Mutterstamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>
CAS 8	SC5314	<i>C. albicans</i> ( $\Delta phr1$ , $\Delta ura3$ )	Saporito-Irwin <i>et al.</i> , 1995
CWH11	CAS8	<i>C. albicans</i> ( $\Delta phr1$ , <i>URA3</i> , <i>CdPHR1</i> )	Diese Arbeit / Heinz <i>et al.</i> , 2000
Wb2d	WT	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ade2$ , $\Delta ura3$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ )	Vai <i>et al.</i> , 1996
SC1pH	Wb2d	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[ <i>URA3</i> , <i>CdPHR1</i> ])	Diese Arbeit
SC2pH	Wb2d	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC2[ <i>URA3</i> , <i>PHR2</i> ])	Diese Arbeit
SC1pH-16	SC1pH	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[ <i>URA3</i> , <i>CdPHR1</i> ], p16[ <i>TRP1</i> , <i>RIM101-16</i> ])	Diese Arbeit

SC1pH-31	SC1pH	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[URA3, CdPHR1], p31[TRP1, RIM101-31])	Diese Arbeit
SC2pH-16	SC2pH	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ ; pSC1[URA3, PHR2], p16[TRP1, RIM101-16])	Diese Arbeit
SC2-pH-31	SC2pH	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[URA3, PHR2], p31[TRP1, RIM101-31])	Diese Arbeit
SC2pH-0	SC2pH	<i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta gas1$ , $\Delta ura3$ , $\Delta ade2$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[URA3, CdPHR1], pFL45S[TRP1])	Diese Arbeit
20001HTU	Wildtyp	<i>C. glabrata</i> ( $\Delta ura3$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ )	Kitada <i>et al.</i> , 1995
CG1pH	2001HTU	<i>C. glabrata</i> ( $\Delta ura3$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[URA3, CdPHR1])	Diese Arbeit
CG2pH	2001HTU	<i>C. glabrata</i> ( $\Delta ura3$ , $\Delta his3$ , $\Delta trp1$ , pSC1[URA3, PHR2])	Diese Arbeit
AN197	WT	<i>A. nidulans</i> (lysF88, suA1, adE20, pabaA1, yA2)	Weidner <i>et al.</i> , 1997
AN197pH	AN197	<i>A. nidulans</i> (lysF88, suA1, adE20, pabaA1, yA2, pSM3[lysF, CdPHR1])	Diese Arbeit

### II.9.1.3. Stämme aus dem epidemiologischen Teil der Arbeit

Die Stämme des epidemiologischen Teils dieser Arbeit sind mit allen Charakteristika im Anhang tabellarisch aufgeführt (Seiten 123 ff.).

## II.9.2. Bakterien

### II.9.2.1 Referenzstämme

Für die Klonierung von PCR Produkten in den pCR2.1 Vektor des kommerziell erhältlichen TOPO-TA Kloning Kits wurde der mitgelieferte *Escherichia coli* Stamm One-shot

Top 10 (Invitrogen) verwendet. Für alle weiteren gentechnischen Arbeiten in dieser Studie wurde der *E. coli* Stamm XL-blue MRF' verwendet (Stratagene).

### *II.9.2.2. Gentechnisch modifizierte Stämme*

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Plasmide wurden in *E.coli* XL1 blue MRF' Zellen gehalten. Plasmidtragende Zellen werden in allen Fällen über eine Ampicillin-Resistenz Kassette selektiert.

## **II.10. Isolierung von genomischer DNA aus Hefezellen**

Das untenstehende Protokoll entspricht einer sogenannten MINI-Prep. Die erhaltene Menge an DNA reicht etwa für 20 Southern Blots. Werden größere Mengen benötigt, kann das Protokoll leicht modifiziert werden.

### **Vorbereitungen am Tag vor der Isolierung**

Stocklösungen

2M Sorbitol (sterilfiltrieren)
500mM EDTA
20% SDS
1M Kaliumphosphat ( $K_3PO_4$ ), pH=7,5

Animpfen

Hefestamm unter sterilen Kautelen in 15ml YPD Medium animpfen und über Nacht bei 30°C im Schüttelbad inkubieren.

### **Direkt vor der Isolierung**

Benötigte Reagenzien (Stocklösungen siehe oben)

Weiterhin: Dithiothreitol (DTT), Zymolase, neutrales Phenol, Chloroform, 100% Ethanol (eisgekühlt), 70% Ethanol (eisgekühlt), RNase.

## Arbeitslösungen

Lösung	Volumen pro Ansatz	Mischung für 10 Ansätze	
1 M Sorbitol	2 ml	10 ml ad 20 ml	2 M Sorbitol H <sub>2</sub> O
Zymolase- Lösung	1000 µl	5ml 500 µl 100 µl ad 10 ml 4 mg	2 M Sorbitol 1M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5 1 M DTT H <sub>2</sub> O Zymolase
Lösung 1	800 µl	800 µl 80 µl ad 8 ml	500 mM EDTA 20% SDS H <sub>2</sub> O

Isolierungsprotokoll

Die über Nacht angezüchtete Kultur wird in 15 ml Falcontubes abzentrifugiert (4000 rpm, 3 min), der Überstand wird verworfen. Das Zellsediment wird in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und in ein großes Eppendorfgesäß (2 ml) überführt. Nach erneuter Zentrifugation in der Tischzentrifuge (8000 rpm, 1 min) und Verwerfen des Überstandes erfolgt die gründliche Resuspension der Zellen in 1 ml Zymolaselösung. Zur enzymatischen Abdaung der Zellwände erfolgt nun die Inkubation bei 37°C unter heftigem Schütteln für 90 min. Die zellwandlosen Hefezellen (Spheroplasten) werden anschließend durch Zentrifugation (8000 rpm, 1 min) gernetet, in 1 M Sorbitol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (8000 rpm, 1 min) und Verwerfen des Überstandes in 800 µl Lösung 1 aufgenommen und gründlich resuspendiert. Nach diesem Schritt erfolgt die Zugabe von 1 ml eines Phenol-Chloroform (1:1) Gemisches und erneute Inkubation bei 37°C unter heftigem Schütteln für 60 min. Anschließend wird nach einer Zentrifugation (14000 rpm, 3 min) die obere, wässrige Phase (800 µl) in ein neues Eppendorfgesäß (2 ml) überführt, erneut mit 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) gründlich vermischt und wiederum zentrifugiert (14000 rpm, 3 min). Von der oberen, wässrigen Phase werden nun je 400 µl in zwei kleine Eppendorfgesäße (1 ml) überführt. Die DNA wird durch Zuga-

be von 1 ml eiskaltem Ethanol in jedes der Caps gefällt und abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min, bei 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wird die pelletierte DNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (14000 rpm, 2 min, bei 4°C) und für 10 min bei 37°C getrocknet. Nachdem keine Flüssigkeit mehr im Eppendorfgefäß beobachtet werden kann, wird die DNA in je 100 µl mit RNase versetztem Wasser (1 µl RNase auf 1ml H<sub>2</sub>O) gelöst. Die Konzentration an DNA kann photometrisch bestimmt oder durch Visualisierung eines Aliquots (1 µl) auf einem Agarosegel im Vergleich zu einem Massenstandard (Smartladder, eurogentec) geschätzt werden.

### **II.11. Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefezellen**

Im Gegensatz zu DNA ist RNA sehr empfindlich, das Ergebnis der Präparation ist dabei insbesondere durch ubiquitär vorkommende, RNA spaltende Enzyme (RNAsen) gefährdet. Daher werden alle für die RNA Präparation benötigten Lösungen mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt (siehe Materialteil). Der Arbeitsplatz ist vor Beginn der Präparation zu reinigen (beispielsweise mit RNase-Zap, Ambion), man verwendet spezielle, RNase-freie Microfugecaps. Wichtig ist das konsequente Arbeiten auf Eis. Für alle Schritte sollten Handschuhe getragen werden, die ebenfalls mit RNase-Zap gereinigt wurden.

#### **Vorbereitungen am Tag vor der Isolierung**

Stocklösungen

DEPC H <sub>2</sub> O TES 3 M Natriumacetat
---

Weiterhin werden 100 ml des Mediums benötigt, in dem die RNA Synthese induziert werden soll.

Animpfen

Hefestamm unter sterilen Kautelen in 100 ml YPD Medium animpfen und über Nacht bei 30°C im Schüttelbad inkubieren.

### Vorbereitungen am Tag der Isolierung

Benötigte Reagenzien Stocklösungen siehe oben.

Weiterhin: Saures Phenol, neutrales Phenol, Chloroform, 100% Ethanol, 70% Ethanol.

Induktion der

RNA-Synthese

Die Zellzahl der über-Nacht Kultur wird mit Hilfe einer Zählkammer gegebenenfalls in einer 1:100 Verdünnung ermittelt.  $4,5 \times 10^9$  Zellen werden daraufhin in 100 ml Induktionsmedium gegeben, das bereits auf die gewünschte Temperatur erwärmt wurde. Die Induktion der RNA Synthese erfolgt im Regelfall für 50 min.

### Isolierungsprotokoll

Nach der Induktion der RNA – Synthese wird die Kultur in zwei Greiner-Röhrchen á 50 ml überführt und abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, bei 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes werden beide Zellsediments zusammen in 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und in ein großes Eppendorfgefäß (2 ml) überführt. Die Zellen werden erneut abzentrifugiert (8000 rpm, 1 min, bei 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes in 600 µl TES resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl saurem Phenol erfolgt eine gründliche Vermischung (vortexen) und anschließend eine Inkubation bei 65°C. Hierbei ist auf eine regelmäßige Durchmischung des Ansatzes (alle 15 min) zu achten. Nach der Inkubation wird der Ansatz auf Eis für 30 sek gekühlt, es folgt eine Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, bei 4°C). 600 µl der oberen, wässrigen Phase werden anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in dem 600 µl sauren Phenols vorgelegt wurden. Nach gründlicher Durchmischung für 30 sek (vortexen) und anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, bei 4°C) werden 550 µl der oberen, wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in dem 550 µl eines Phenol (neutrales Phenol)/Chloroform Gemisches (1:1) vorgelegt wurden. Nach 2 min gründlichen Durchmischens und Zentrifugation (14000 rpm, 1 min, bei 4°C) werden 500 µl der oberen, wässrigen Phase in ein

neues Eppendorfggefäß zu 500 µl des Phenol/Chloroform (1:1) Gemisches gegeben. Nach erneuter gründlicher Durchmischung und Zentrifugation werden 400µl der oberen, wässrigen Phase in ein neues Eppendorfggefäß überführt, in dem 1 ml 100% Ethanol und 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) vorgelegt wurden. Dieser Ansatz wird für 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (14000 rpm, 15 min, bei 4°C). Das hierbei entstehende Pellet (kann sehr klein sein) entspricht der RNA, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 400 µl 70% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, 1 min, bei 4°C) und restlosem Verwerfen des Überstandes kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wird die RNA in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und von da an beständig auf Eis gehalten oder bei -20°C aufbewahrt.

## **II.12. Isolierung von Plasmid – DNA aus Bakterien**

### **II.12.1. Plasmidisolierungskits**

Je nach benötigter Menge an Plasmid-DNA sind verschiedene Präparationskits kommerziell erhältlich. Für die Experimente in dieser Studie wurden folgende Kits verwendet, die beide auf der Bindung der Plasmide in speziellen Silicagel-Anionen Matrizen beruhen:

QIAprep Spin MINIprep-Kit

QIAprep Spin MIDIprep-Kit

### **II.12.2. Schnellpräparation ohne Kit**

Animpfen am Vortag    Eine klonale Kolonie des plasmidtragenden Bakterienstammes wird in 2 ml Medium unter Selektionsdruck angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelbad angezüchtet.

Benötigte Lösungen

Lösung 1 (kann bei 4°C aufbewahrt werden)	50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
Lösung 2	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung 3 (kann bei 4°C aufbewahrt werden)	5 M Kaliumacetat 11,5 Vol% Essigsäure

### Protokoll

Die über-Nacht Kultur wird abzentrifugiert (14000 rpm, 3 min), der Überstand verworfen und das Zellsediment in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. werden 200 µl Lösung 2 zugegeben. Nach gründlichem Mischen erfolgt eine Inkubation für 5 min. auf Eis. Anschließend werden 150 µl Lösung 3 zugegeben, nach gründlichem Mischen und erneuter Inkubation auf Eis für 5 min erfolgt eine Zentrifugation (14000 rpm, 3 min). 400 µl des Überstandes werden sauber abpipetiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in dem 800 µl eiskalten Ethanol vorgelegt wurden. Nach einmaligem Schütteln folgt eine Inkubation bei -20°C für 15 min und anschließende Pelletierung der Plasmid-DNA durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, bei 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet mit 400 µl 70% Ethanol überschichtet, erneut zentrifugiert (14000 rpm, 1 min) und nach erneutem Verwerfen des Überstandes bei 37°C bis zum vollständigen Verdunsten der Alkoholreste getrocknet. Abschließend wird die Plasmid-DNA in 30 µl RNase H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Ausbeute der Präparation kann durch Visualisierung eines Aliquots (1-3 µl) in einer Gelelektrophorese abgeschätzt werden.

## II.13. Gelelektrophorese

### II.13.1. Horizontale DNA Gelelektrophorese im Agarosegel

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA nach dem Molekulargewicht erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen. Die entsprechende Menge Agarose wird in 1xTAE durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst und das Gel nach Kühlung auf circa 60°C in die vorgesehene Form gegossen. Danach lässt man das Gel bis zur vollständigen Polymerisation abkühlen. Je nach verwendetem Einsatz (Kamm) fassen die Taschen zur Aufnahme der DNA-Proben zwischen 10 und 30 µl. Die DNA-Proben werden mit sterilem H<sub>2</sub>O auf das jeweilige Volumen ergänzt und mit 10 Vol% Blaumarker (DNA) vermischt. Die Auftrennung erfolgt bei Raumtemperatur in 1xTAE Laufpuffer mit Spannungen zwischen 20 V (über Nacht Auftrennung) und 150 V (Auftrennung in circa 1 h), und zwar aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuren stets in Richtung Anode. Die farbigen Fronten dienen als Orientierung für den erreichten Grad der Auftrennung. Bei jeder Auftrennung wird ein Größen- und Gewichtsstandard (Smartladder) mitgeführt. Nach erfolgter Auftrennung wird die DNA durch 10minütige Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (10µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromidgefärbte DNA-Fragmente können unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert werden.

### II.13.2. DNA Größenmarker

Als DNA Größenstandard wurde die Smartladder (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet, die für Fragmentgrößen zwischen 10 kB und 200 bp eine Größenabschätzung erlaubt (siehe Abbildung). Anhand der Intensität der Färbung einer Bande lässt sich durch Vergleich mit den standardisierten Banden dieser Leiter eine semi-quantitative Abschätzung der DNA Menge vornehmen. Die Größe von hybridisierenden RNA Banden (siehe unten) wurde in Relation zu 18s und 25s rRNA Banden angegeben.

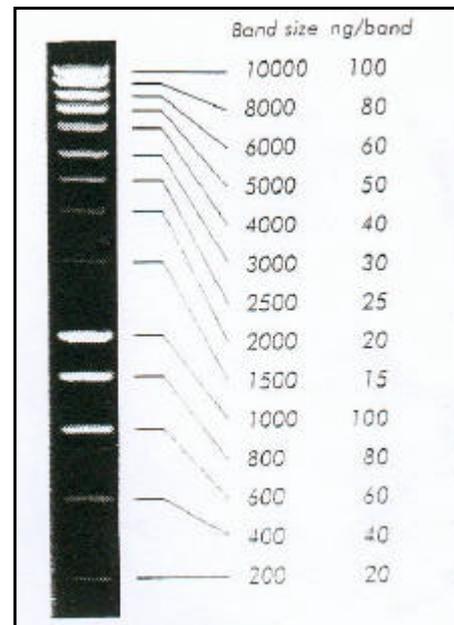


Abb. M1: DNA Größenmarker

### II.13.3. Horizontale RNA Gelelektrophorese im denaturierenden Agarosegel

#### Herstellung des denaturierenden Gels

Zur Herstellung eines denaturierenden Agarosegels werden 180 ml DEPC-H<sub>2</sub>O mit 2 g Agarose bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgekocht. Nach Abkühlung auf circa 60°C gibt man 3,6 ml Formaldehyd zusammen mit 20 ml 10x MOPS zu dem Gel und gießt es direkt in eine zuvor mit RNase-Zap gereinigte Gelkammer.

#### Vorbereitung der Proben

15 µl der RNA Lösung werden mit 15 µl eines Premix (500 µl Formamid, 175 µl Formaldehyd, 100 µl 10x MOPS) und 3 µl Blaumarker (RNA) versetzt und für 10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wird die Mischung kurz auf Eis abgekühlt und in die Geltasche eingebracht.

#### Elektrophoretische Auftrennung

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt wie bei DNA-Gelen. Als Laufpuffer wird jedoch 1x MOPS verwendet. Wegen der schleimhautreizenden Bestandteile des Gels sowie etwaiger DEPC Rückstände im Laufpuffer erfolgt die Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel stets unter dem Abzug. Die Färbung des Gels entspricht dem oben beschriebenen Vorgehen.

### II.14. DNA-Extraktion aus einem Elektrophoresegel

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Elektrophoresegel wurden folgende kommerziell erhältliche Kits nach den vom Hersteller empfohlenen Protokollen verwendet:

Qiagen Nucleotide Removal Kit

GeneClean II Kit

## II.15. Transfer von Nukleinsäure auf Hybridisierungsmembranen (Blotting)

### II.15.1. DNA-Transfer im Southern Blot

Ziel des Southern Blots ist der Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran.

#### Vorbereitung des Agarosegels

Vor dem Transfer der DNA muss diese denaturiert werden. Zu diesem Zweck wird das Agarosegel für 2 x 15 min in Denaturierungspuffer gewaschen und anschließend für 2 x 15 min in Neutralisierungspuffer neutralisiert.

#### Aufbau des Transfersystems

Prinzip des Blottens ist die Ausnutzung einer Kapillarkraft zum Transfer der Nukleinsäuren.

Im nebenstehend schematisch dargestellten Modell bauen die Papierhandtücher einen Sog auf, der mit dem Hochsalzpuffer die

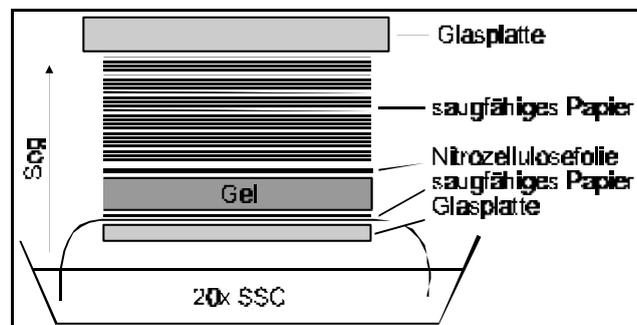


Abb. M 2 Aufbau eines Southern Blots

DNA transferiert. Wichtig ist, einen „Kurzschluss“ dieses Sogs seitlich vom Gel durch Abdichten z.B. mit Röntgenfilm zu verhindern. Der Transfer erfolgt über mindestens 6 Stunden oder über Nacht. Anstelle der klassischerweise verwendeten Nitrocellulose als Trägermaterial wurden in dieser Studie Nylonmembranen verwendet.

### Vernetzung der DNA mit der Membran (Crosslinken)

Nach dem Transfer der DNA auf die Membran ist es essentiell, die Position der Taschen zu markieren. Anschließend muss die DNA durch UV-Crosslinking an der Membran fixiert werden. Dies geschieht durch automatisierte Crosslinker (Stratagene).

#### II.15.2. RNA - Transfer im Northern Blot

Ziel des Northern Blots ist der Transfer von RNA aus einem Gel auf eine Membran. Im Gegensatz zu DNA führenden Gelen sind RNA Gele bereits denaturierend, es ist daher keine Vorbehandlung vor dem Blotten notwendig. Der Aufbau des Blots entspricht dem des Southern Blots, auch hier ist nach dem Transfer eine Vernetzung der Nukleinsäure mit der Membran (Crosslinken) erforderlich.

### II.16. Hybridisierungen (DNA-DNA und RNA-DNA)

#### II.16.1 Sondenlabeling

Alle in dieser Studie beschriebenen Sonden waren DNA Sonden und wurden radioaktiv mit dCTP<sup>32\*</sup> (Amersham) markiert. Das Labeling erfolgte mit Hilfe des Random PrimeIt Labeling Kits (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der Sonden nach der Markierung erfolgte mit dem Qiagen PCR Purification Kit. Direkt vor der Hybridisierung muss die Sonde bei 95°C für 10 min denaturiert werden.

#### II.16.2. Verwendete Sonden

Detektiertes Gen	Sonde
<i>PHR1/CdPHR1</i>	800 bp <i>BspD1</i> Fragment aus <i>PHR1</i> -ORF ausgeschnitten aus pSMS-24
<i>PHR2/CdPHR1</i>	1,6 kB <i>HindIII</i> Fragment aus <i>PHR2</i> -ORF ausgeschnitten aus pFM-6

<i>ACT1</i>	PCR-Amplifikat von genomischer DNA ( <i>C. albicans</i> ) mit den Primern OK1 und OK2
-------------	---

### II.16.3. Hybridisierung

Die nukleinsäuretragenden Nylonmembranen werden in auf 65°C vorgewärmtem Monodpuffer (circa 20 ml) prähybridisiert (15 min, 65°C). Anschließend wird dieser Puffer verworfen und 20 ml frischer, ebenfalls auf 65°C vorgewärmter Monodpuffer mit der markierten und denaturierten Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C. Anschließend wird der Blot für zweimal 15 min in Hybridisierungswaschpuffer gewaschen.

Die noch feuchte Membran wird sorgfältig in Frischhaltefolie eingepackt und in einer Röntgenkassette fixiert. Anschließend wird in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm in die Kassette eingebracht. Die Exposition erfolgt im Regelfall für etwa 5 h. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte automatisiert.

### II.17. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der raschen, exponentiellen Amplifikation von DNA Fragmenten. Das Prinzip basiert auf der Verwendung einer hitzeresistenten DNA-Polymerase (*Taq* [*Thermus aquaticus*]-Polymerase und ist hinreichend beschrieben (z.B. Stryer, 1995). In dieser Studie wurde ausschließlich die AmpliTaq-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer) mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Ein repräsentativer PCR Ansatz ist in der folgenden Tabelle beschrieben:

Template DNA	1µl (entsprechend 100 – 500 ng)
Forward Primer	50 pmol (soll das Produkt direkt sequenziert werden 10 pmol)
Reverse Primer	50 pmol (siehe Forward Primer)
10 PCR Puffer	10% des Reaktionsvolumens
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP	2 µl der Stocklösung

AmpliTaq-Polymerase      0,5 µl

Das Reaktionsvolumen wurde je nach Bedarf zwischen 20 µl und 100 µl gewählt. Ein repräsentativer Amplifikationszyklus (Programm für den Thermocycler) ist in der folgenden Tabelle beschrieben:

Primäre DNA Denaturierung	95°C	5 min	
Annealing (Anlagerung der Primer)	T <sub>A</sub> *	45 sek	} 30-40 Zyklen
Polymerisation	72°C	90 sek	
Denaturierung	95°C	30 sek	
Finale Extension	72°C	5 min	

\* T<sub>A</sub> entspricht der Annealingtemperatur der Primer, die sich für jeden Primer aus dem GC / AT Gehalt nach der folgenden Formel errechnet:

$$T_A = 4 \cdot (n_G + n_C) + 2 \cdot (n_A + n_T) - 2$$

mit n<sub>X</sub> als absoluter Anzahl des Nukleotides X (= A,C,G oder T) in der Primersequenz.

Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer findet sich im Anhang (A1, Seite 116).

### II.17.1 Colony PCR

Anstelle von reiner DNA kann auch Koloniematerial, das ja DNA enthält, als „Template“ verwendet werden. Hierzu wird eine Kolonie in 100 µl H<sub>2</sub>O eingerieben. Davon werden 10 µl als Template eingesetzt. Negative Ergebnisse sollten stets in Zweifel gezogen werden, während bei sorgfältigem Arbeiten positive Ergebnisse hinreichend zuverlässig sind.

II.17.2. Inverse PCR

Die Technik der inversen PCR dient der Aufdeckung unbekannter Sequenzen, die benachbart zu einem bekannten Sequenzabschnitt liegen (Abb. M 3, Schritte 1-4)

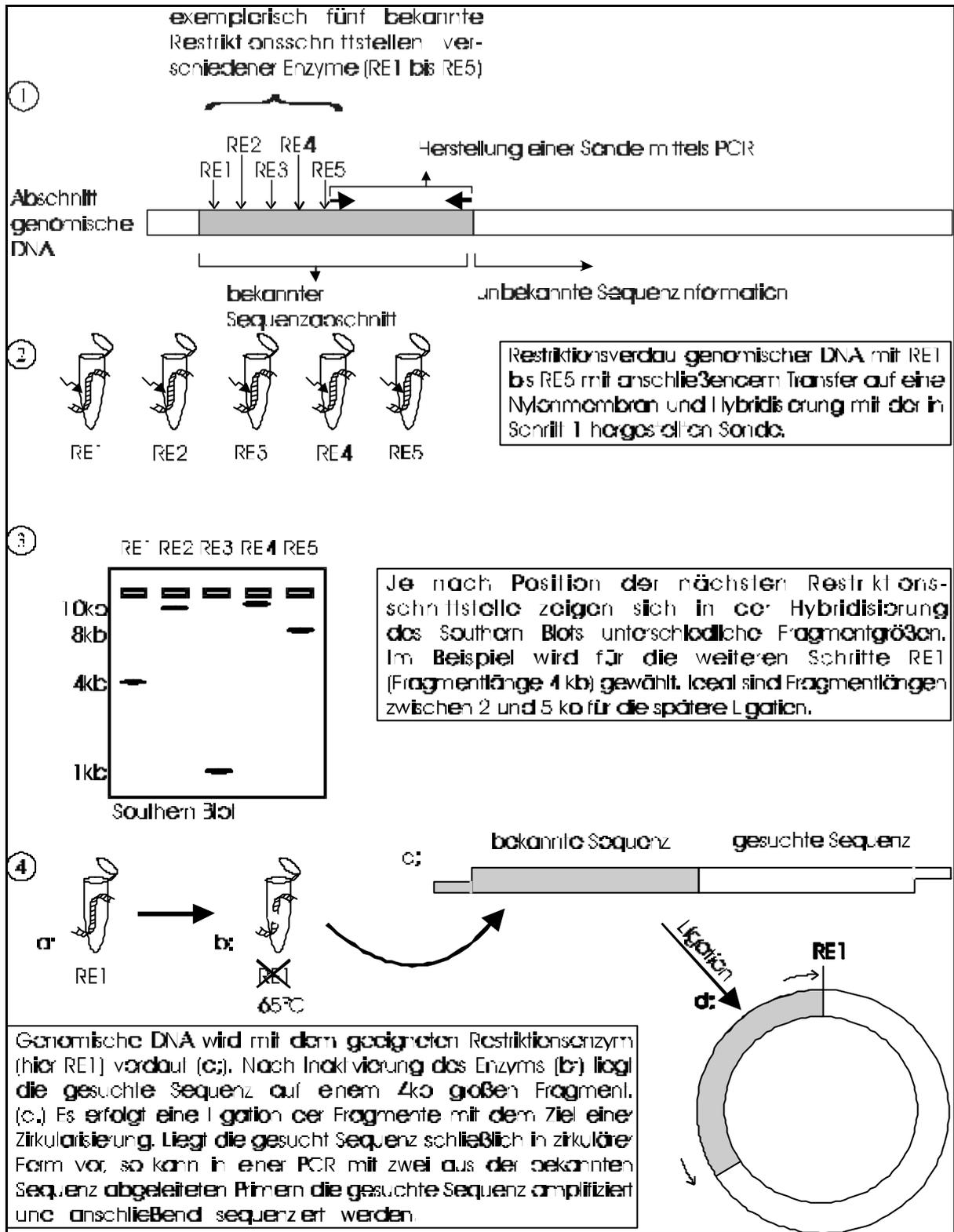


Abb. M 3: Prinzip der inversen PCR

## II.18. Ammoniumacetatfällung von PCR Produkten

Zu 40µl PCR Reaktion werden 40µl Ammoniumacetat (4 M, pH 4,6) sowie 240µl eiskaltes 100% Ethanol gegeben. Nach kurzer Durchmischung erfolgt eine Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, bei 4°C) mit Verwerfen des Überstandes. Das Pellet (meist nur schwer sichtbar) wird mit 200 µl 70% Ethanol überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, bei 4°C) wird der Überstand sorgfältig abpipettiert und verworfen. Den restlichen Alkohol lässt man bei 50°C verdunsten. Anschließend wird die DNA je nach Ausbeute der Amplifikation in 8 - 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

## II.19. Klonierungen

### II.19.1. Restriktionsenzyme

<b>Enzym</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Schnittstelle</b>	<b>Puffer/ Temperatur</b>
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	<i>Bam</i> HI-Puffer +BSA/37°C
<i>Bsp</i> DI (= <i>Cla</i> I)	<i>Bacillus species</i>	5'-ATCGAT-3' 3'-TAGCTA-5'	NEB4/37°C
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	<i>Eco</i> RI Puffer/ 37°C
<i>Eco</i> RV	<i>Escherichia coli</i>	5'-GATATC-3' 3'-CTATAG-5'	NEB2/25°C
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	NEB2/37°C
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	NEB3/37°C
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	NEB4/25°C
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'-TCTAGA-3' 3'-AGATCT-5'	NEB2/25°C

<i>Xmn</i> I	<i>Xanthomonas</i>	5'-GAANNNTTC-3'	NEB2/25°C
	<i>campestris</i>	3'-CTTNNNAAG-3'	

Alle Restriktionsenzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten von New England Biolabs und wurden nach den empfohlenen Protokollen gebraucht.

### II.19.2. Sonstige für Klonierungen verwendete Enzyme

#### Alkalische Phosphatase (Shrimp)

Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) katalysiert die 5' Dephosphorylierung von DNA. Bei Klonierung eines DNA Fragmentes in einen Plasmidvektor über ein einzelnes Enzym verhindert die Dephosphorylierung des Vektors nach der Linearisierung die frustrane Religation ohne Interposition des Fragmentes. In dieser Studie wurde stets die SAP von Boehringer Mannheim mit dem beigefügten Puffer und unter den empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. Wichtig ist die vollständige Inaktivierung des Enzyms nach der Dephosphorylierung, die durch Erhitzen auf 65°C für 15 min erreicht wird.

#### T4 DNA Polymerase

T4 DNA Polymerase katalysiert die DNA-Synthese in 5' → 3' Richtung bei Vorhandensein eines Templates und eines Primers. Außerdem besitzt das Enzym 3' → 5' Exonukleaseaktivität. Es wird daher zum Entfernen von 3' und 5' Überhängen nach Restriktionsverdau verwendet. Dies ist erforderlich, wenn eine blunt-end Ligation, also eine Ligation ohne zueinander passende Überhänge, durchgeführt werden soll. In dieser Studie wurde stets die T4 DNA Polymerase von New England BioLabs mit dem beigefügten Puffer unter den empfohlenen Bedingungen (12°C, 20 min, 100µmol dNTP) verwendet.

### T4 DNA Ligase

T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Termini in doppelsträngiger DNA. In dieser Studie wurde stets die T4 DNA Ligase von New England BioLabs mit dem beigefügten Puffer verwendet. Alle Ligationen wurden bei 16°C über Nacht in Reaktionsvolumina zwischen 10 µl und 20 µl durchgeführt.

### II.19.3. Basisplasmide

#### pCR2.1. (aus TOPO TA Kloning Kit, Invitrogen)

Vorgefertigtes Plasmid zur effizienten Klonierung von PCR-Produkten mit endständig unpaaren Adenosin Resten.

#### pRS316 (Sikorski und Hieter, 1989)

Shuttle Vektor für *Saccharomyces cerevisiae* basierend auf pBSK(+) (Stratagene), *URA3* fungiert als Selektionsmarker.

#### pLYSF (Weidner *et al.*, 1997)

*Aspergillus nidulans* Vektor, *LysF* fungiert als Selektionsmarker.

#### pFL45S (Christianson *et al.*, 1992)

*S. cerevisiae* 2µ high-copy shuttle Vektor mit *TRP1* als Selektionsmarker

## **II.20. Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen in dieser Studie wurden in der automatisierten Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe des *Prism ready reaction dye deoxy terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Durch Zugabe von di-deoxy-Nukleotiden kommt es bei einer Polymerisation zu Kettenabbrüchen, die eine Sequenzierung erlauben. Primer zur Amplifikation wurden vom Beginn der zu sequenzierenden Nukleinsäurefolge, beziehungsweise bei doppelläufiger Sequenzierung von Beginn und Ende der zu sequenzierenden Nukleinsäurefolge, abgeleitet. Die Annealingtemperatur für jeden Primer errechnete sich aus der Nukleinsäureverteilung analog dem Vorgehen bei einer PCR (siehe Seite 42). Die Auswertung der Fragmente nach Elektrophorese im Polyacrylamidgel erfolgte automatisiert (ABI Prism Sequencer 377, Perkin Elmer).

### **II.20.1. Genbankregistrierungen**

<b>Gen</b>	<b>Kurzbeschreibung</b>	<b>Autoren</b>	<b>Reg.-Nr.</b>
<i>CdPHR1</i>	<i>PHR1</i> Homolog von <i>C. dubliniensis</i>	W. Heinz, O. Kurzai, F. Mühlshlegel	AF184907
<i>CdPHR2</i>	<i>PHR2</i> Homolog von <i>C. dubliniensis</i>	W. Heinz, O. Kurzai, F. Mühlshlegel	AF184908
<i>CgACT1</i>	Aktin-Gen von <i>C. glabrata</i>	O. Kurzai, M. Weig, F. Mühlshlegel	AF069746

## **II.21. Transformation und Plasmidmultiplikation in *E. coli***

Alle bakteriellen Transformationen in dieser Studie erfolgten mit Hilfe der Elektroporation, einem sehr effizienten Verfahren zur Einbringung von Plasmiden in das Zytoplasma sogenannter elektrokompenter Bakterien. Hierbei wird mittels eines kurzen, aber starken Stromstoßes die bakterielle Zellwand kurzfristig durchgängig für Plasmide gemacht.

### II.21.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

In 700 ml LB Medium werden 10 ml einer über-Nacht-Kultur von *E. coli* (XL1 blue MRF') angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,6 inkubiert. Anschließend wird die Kultur für 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, bei 4°C). Das Zellsediment wird nach Verwerfen des Überstandes in 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Hierauf folgt eine Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, bei 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 200 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Dieser Schritt wird unter schrittweiser Absenkung des Resuspensionsvolumens auf 20 ml und 1,75 ml wiederholt, wobei die Bakterien in 20% Glycerin resuspendiert werden. Schließlich werden die Bakterien in 40 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C aufbewahrt.

### II.21.2. Elektroporation

1 µl einer Ligationsreaktion wird in 9µl H<sub>2</sub>O auf Eis zu 40µl elektrokompetenter *E. coli* Zellen gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wird der Ansatz in eine Elektroporationsküvette luftblasenfrei überführt. Die Bedingungen für den Elektroporationsstrom sind 2500 V, 25µF und 400 Ω. Sofort nach der Elektroporation werden die Zellen in 1 ml SOC Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgt Selektion von plasmidtragenden Zellen auf ampicillinhaltigen LB Agarplatten über Nacht bei 37°C.

## **II.22. Transformation von Hefezellen**

### II.22.1. Transformation von Hefezellen nach der Lithium-Acetat Methode

Vorbereitungen am Tag vor der Transformation

Animpfen                      Der Rezipientenstamm wird über Nacht in 20 ml YPD (supplementiert je nach Auxotrophie) bei 30°C im Schüttelbad angezüchtet.

Es wird 1 µg zu transformierende DNA benötigt.

### Vorbereitungen am Tag der Transformation

#### Herstellung einer Kultur

in der Logphase              Die Zellzahl in der über-Nacht-Kultur wird in der Zählkammer bestimmt und ein Aliquot mit  $10^8$  Zellen in 50 ml frisches Medium überimpft. Die neue Kultur wird bei 30°C im Schüttelbad bis zum Erreichen einer Zelldichte von  $10^7$ /ml inkubiert (im Regelfall etwa 4 Stunden).

#### Benötigte Lösungen

Lösung 1	1x TE 1x Lithiumacetat in H <sub>2</sub> O
Lösung 2	1x TE 1x Lithiumacetat 40% PEG in H <sub>2</sub> O

### Transformationsprotokoll

Die angelegte Kultur wird beim Erreichen der gewünschten Zelldichte ( $10^7$ /ml) abzentrifugiert (4000 rpm, 4 min), das Zellsediment nach Verwerfen des Überstandes in 500 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und ein Eppendorfgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) und Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 500 ml Lösung 1 aufgenommen und die Zellzahl dieser Suspension in der Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wird anschließend durch Verdünnen oder Konzentration auf  $2 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt. 50 µl dieser Suspension zusammen mit 1 µg zu transformierender

DNA, 10  $\mu$ l Lachsperm DNA, die zuvor für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert wurde, sowie 300  $\mu$ l Lösung 2 bilden den Transformationsansatz. Dieser wird im Schüttelbad bei exakt 30°C für 30 min inkubiert und anschließend für 3 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Hierauf werden die Zellen abzentrifugiert (10000 rpm, 1 min) und nach Verwerfen des Überstandes in 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) werden die Zellen in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und gleichmäßig auf ein Selektivmedium ausgestrichen. Die Platten sollten mindestens 3 d bei 30 °C bebrütet werden, Transformanten zeigen sich spätestens nach 5 d.

### II.22.2. Transformation von Hefezellen mit Hilfe der Spheroplastenmethode

#### Vorbereitungen am Tag vor der Transformation

Animpfen                      Der Rezipientenstamm wird unter sterilen Kautelen in 10 ml YPD (je nach Auxotrophien supplementiert) angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttelbad inkubiert.

Es werden 5  $\mu$ g an zu transformierender DNA benötigt.

#### Vorbereitungen am Tag der Transformation

Benötigte Lösungen

SPE – Lösung	1 M Sorbitol 50 mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 10 mM EDTA pH 7,5 in H <sub>2</sub> O
STC – Lösung	10mM Tris pH 7,5 10 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O

PEG – Lösung	20% PEG 8000 (Polyethylenglycol) 0,1 M Tris pH 7,5 0,1 M CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
SOS – Medium	1 M Sorbitol 6,5 mM CaCl <sub>2</sub> 33% YPD 25 µg/ml Uridin in H <sub>2</sub> O

### Herstellen einer Kultur

In der Logphase      Zu der über-Nacht-Kultur wird 200 ml Medium gegeben und diese neue Kultur bis zu einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^7$ /ml Zellen bei 30°C inkubiert (im Regelfall etwa 4 Stunden).

### Transformationsprotokoll

Die Sekundärkultur wird nach Erreichen der gewünschten Zellzahl abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, bei 15°C) und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 20 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 5 min, bei 15°C) und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in 19,6 ml SPE-Lösung mit 40 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Hierzu werden 400 µl Zymolase gelöst in SPE (5mg/ml) gegeben und die Mischung bei 30°C für 12 min inkubiert. Die Spheroplasten werden anschließend pelletiert (2000 rpm, 5 min, bei minimaler Dezeleration) und vorsichtig in 20 ml 1 M Sorbitol und anschließend in 20 ml STC-Lösung unter denselben Bedingungen. Danach werden die Zellen in 1,5 ml STC-Lösung aufgenommen. Zu 100 µl dieser Suspension werden 5µg zu transformierende DNA und 5 µl zuvor bei 95°C für 5 min denaturierter Lachssperm DNA (Pharmacia Biotech) sowie 1 ml PEG-Lösung gegeben. Dieser Transformationsansatz wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (2000 rpm, 2 min, bei minimaler Dezeleration ohne Bremsen) und nach Verwerfen des Überstandes Aufnahme der Spheroplasten in 1,5 ml SOS Medium. Nach Inkubation bei 30°C für 40 min, ohne zu schütteln, werden

die Spheroplasten auf geeigneten, mit 1 M Sorbitol isoosmolar gemachten Agarplatten ausgestrichen. Transformanten zeigen sich nach 2-5 Tagen Inkubation bei 30°C.

## II.23. Phänotypische Merkmale von *C. dubliniensis*

### II.23.1. Chlamydosporenmorphologie

Die Chlamydosporenmorphologie wird auf Reis-Tween Agar bewertet. Dazu wird der entsprechende Stamm unter sterilen Kautelen Z-förmig in der Mitte der Agarplatte ausgestrichen und mit einem sauberen Deckglaschen zum Erreichen einer mikroaerophilen Umgebung bedeckt. Die Platten werden für 48 h bei 25°C inkubiert. Die Chlamy-

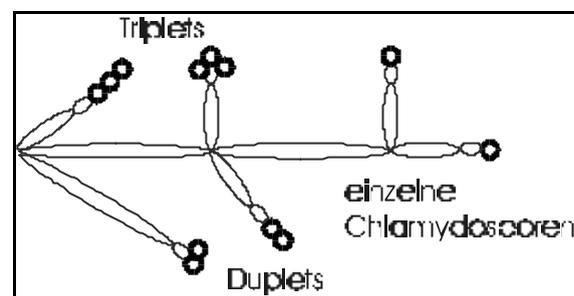


Abb. M 4 Chlamydosporenmorphologie

dosporen lassen sich durch direkte Mikroskopie der Zellen (10x, 40x) als endständige dickwandige, doppelbrechende kugelförmige Gebilde, die über eine Stützzelle mit den Hyphen verbunden sind, auf der Platte beobachten. Abbildung M 4 zeigt Duplets und Triplets, die definitionsgemäß von einer einzigen Stützzelle gehalten werden. Die Einteilung erfolgte in die Kategorien +++1 (Triplets und Duplets), ++1 (Duplets), ++ (reichhaltig), + (deutlich), +/- (wenig).

### II.23.2. Wachstum bei 45°C

Zur Einordnung des Wachstumsverhaltens bei 45°C wird der entsprechende Stamm unter sterilen Kautelen auf eine vorgewärmte Platte (YPD) ausgestrichen und für 72 h bei 45°C inkubiert. In dieser Studie wurden die Stämme in - (kein Wachstum), 0 (stark reduziertes Wachstum) und + (normales Wachstum) eingeteilt.

### II.23.3. Koloniefärbung auf CHROMagar Candida

CHROMagar Candida ist ein Medium, das die Klassifizierung verschiedenster *Candida* sp. anhand ihrer Koloniefärbung erlaubt. Obgleich sowohl *C. albicans* als auch *C. dubliniensis* auf diesem Medium grün gefärbt sind, ist beschrieben, dass die *C. dubliniensis* Kolonien eher dunkelgrün im Gegensatz zu den eher hellgrünen *C. albicans* Kolonien erscheinen. Die Beurteilung der Koloniefärbung erfolgte nach Inkubation für 48 h bei 30°C im Vergleich zu zwei Referenzstämmen (*C. albicans* SC5314 und *C. dubliniensis* CBS7987) als hell- oder dunkelgrün.

### II.23.4. Koloniemorphologie auf STAIB Agar

Die Koloniemorphologie wurde makroskopisch (rau oder glatt) und mikroskopisch im Hinblick auf Chlamydosporenbildung nach 48 h bei 30°C beurteilt. Raue Kolonien und Chlamydosporenbildung sind kennzeichnend für *C. dubliniensis*.

## II.24. Resistenztestungen

Die Resistenztestungen im Rahmen des epidemiologischen Studienteils erfolgten mit einem standardisierten Mikrodilutionstest nach DIN Norm in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-C. Korting (Dermatologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München). Die Medienherstellung und technische Vorgehensweise wurde von Schmalreck ausführlich beschrieben (Schmalreck, 1992). Gearbeitet wurde mit einer Verdünnungsreihe für jedes Antimykotikum von 128 µg/ml bis 0,125 µg/ml in HR-Medium. Die Ablesung erfolgte nach 48 Stunden. Folgende Stämme wurden als Kontrollstämmen mitgeführt (mit den minimalen Inhibitionskonzentrationen für Fluconazol, Itraconazol und Amphotericin B):

Stamm	Nummer	MIC-Flu	MIC-Itra	MIC-AB
<i>C. albicans</i>	ATCC <sup>1</sup> 90028	1	1	1
<i>C. stellatoidea</i>	ATCC 20408	1	2	0,25
<i>C. stellatoidea</i>	ATCC 11006	0,5	0,5	0,125
<i>C. dubliniensis</i>	CBS <sup>2</sup> 7987	0,5	0,5	0,25
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 7988	0,5	4	0,125
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	1	16	1
<i>C. tropicalis</i>	CBS 94	0,5	32	8
<i>C. parapsilosis</i>	CBS 604	0,5	1	0,125
<i>C. guilliermondii</i> <sup>3</sup>	CBS 566	0,25	2	0,125
<i>C. maltosa</i>	CBS 5611	1	2	0,25
<i>C. kefir</i> <sup>4</sup>	CBS 834	0,25	0,5	0,125
<i>C. krusei</i> <sup>5</sup>	CBS 573	2	32	0,5

<sup>1</sup>; Referenzstamm der American Type Culture Collection

<sup>2</sup>; Referenzstamm des Centraalbureau voor Schimmelcultures

<sup>3</sup>; Teleomorph ist *Pichia guilliermondii*

<sup>4</sup>; Teleomorph ist *Kluyveromyces marxianus*

<sup>5</sup>; Teleomorph ist *Issatchenkia orientalis*

## **II.26. Biochemische Assimilationsreaktionen**

Alle in dem epidemiologischen Teil dieser Arbeit als *C. dubliniensis* identifizierten Stämme wurden in Zusammenarbeit mit Merlin Diagnostica (Bornheim-Hersel, Deutschland) mit Hilfe des kommerziell erhältlichen MICRONAUT-RC Systems biochemisch charakterisiert. In diesem System werden klinisch relevante Hefen mittels eines aus 21 verschiedenen biochemischen Reaktionen erstellten Profils klassifiziert. Diese Reaktionen sind im Einzelnen in Kapitel 4.7. (Tabelle 5, Seite 81) aufgeführt.

### **III. ERGEBNISSE**

#### **III.1. PHR homologe Gene bei *C. dubliniensis***

##### **III.1.1 PCR mit von *PHR1/PHR2* abgeleiteten Primern**

Bereits bei der ersten Beschreibung von *C. dubliniensis* wurde auf die sehr enge phylogenetische Verwandtschaft dieser neuen Spezies zu *C. albicans* hingewiesen. Hypothetisch erschien es daher möglich, in einer einfachen PCR Reaktion mit von *PHR1 / PHR2* abgeleiteten Primern, Teile homologer Gene in *C. dubliniensis* zu amplifizieren. Zu diesem Zweck wurden von Beginn und Ende des offenen Leserasters von *PHR1* in *C. albicans* die PCR Primer OK3 und OK4 abgeleitet. Mit Hilfe dieser Primer und genomischer DNA von *C. dubliniensis* CBS 7987 als Template wurde zunächst eine PCR Reaktion unter stringenten Bedingungen durchgeführt (30 Zyklen, Annealingtemperatur 50°C). Es zeigte sich jedoch, dass es bei *C. albicans* zwar zu dem erwarteten Amplifikationsprodukt von ca. 1,6 kb kommt, bei *C. dubliniensis* jedoch nicht.

Mit Hilfe degenerierter Primer, die in Alignments der Sequenzen von *PHR1* und *PHR2* aus konservierten Bereichen abgeleitet wurden, gelang jedoch die Amplifikation eines Fragmentes mit der erwarteten Größe von 250 bp. Dieses Amplifikationsprodukt wurde in pCR2.1 kloniert und zwanzig unabhängige Klone anschließend sequenziert. In allen zwanzig Klonen fand sich ein identisches Fragment mit hoher Homologie zu dem entsprechenden Sequenzabschnitt von *PHR2*. Damit war ein erster deutlicher Hinweis für die Existenz von PHR homologen Genen im Genom von *C. dubliniensis* gegeben. Trotz Modifikation der PCR Bedingungen gelang es nicht, ein analoges Segment aus einem *PHR1* Homolog zu amplifizieren.

##### **III.1.2. Identifizierung PHR - homologer Sequenzen**

Um die Existenz von PHR homologen Sequenzen im Genom von *C. dubliniensis* nachzuweisen, wurde genomische DNA von den Referenzstämmen CBS7987 und CBS7988 isoliert und alternativ mit *EcoRI* oder *HindIII* verdaut. Die verdaute DNA wurde auf Nylonmembranen transferiert und alternativ mit von *PHR1* oder *PHR2* abgeleiteten Sonden hybridisiert. Beide

Sonden hybridisierten unter stringenten Bedingungen mit der genomischen DNA von *C. dubliniensis* (Abb. 4).

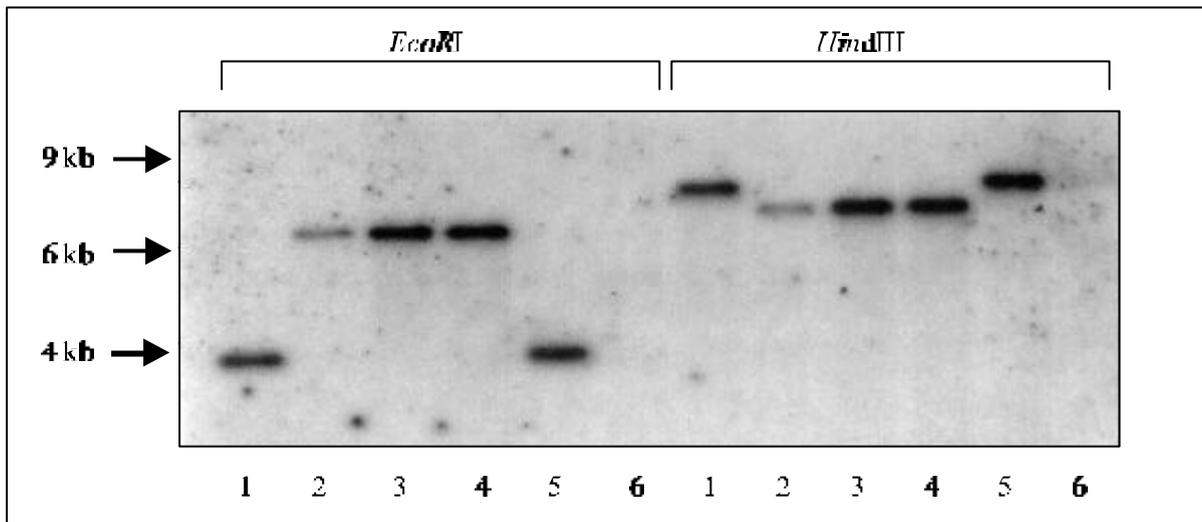


Abb. 4: Hybridisierung von genomischer DNA aus *C. dubliniensis* mit einer *PHR1*-Sonde

Genomische DNA der Stämme *C. albicans* SC5314 (Spur 1), *C. dubliniensis* CBS7987 (Spur 2), CBS 7988 (Spur 3) und CD33 (Spur4), *C. stellatoidea* CBS11006 (Spur 5) und *C. maltosa* CBS5611 (Spur 6) wurde nach Verdau mit *EcoRI* oder *HindIII* mit einer *PHR1*-Sonde hybridisiert. Es zeigt sich ein spezifisches Signal bei allen *C. dubliniensis* Stämmen mit von *C. albicans* differierender Restriktionsfragmentlänge.

Wie erwartet, wurde auch für *C. albicans* und zwei mitgeführte *C. stellatoidea* Stämme ein Signal detektiert (Abb. 4). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Signal bei einer Hybridisierung der Sonden mit genomischer DNA aus *C. maltosa* (Abb. 4). Wie in Abbildung 4 dargestellt, fällt bei beiden Enzymen und beiden Sonden eine unterschiedliche Länge der durch die Hybridisierung identifizierten Restriktionsfragmente bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf. Dagegen entsprechen die Größen der Restriktionsfragmente bei der früher ebenfalls als eigenständig betrachteten Spezies *C. stellatoidea* genau denen von *C. albicans* (Abb. 4). DNA aus verschiedenen anderen chlamydosporennegativen Spezies wurde isoliert und mit den beiden Sonden hybridisiert (Tab. 1).

Tabelle 1: Fragmentrestriktionsgrößen und PCR-Ergebnisse für *PHR1* und *PHR2* bei verschiedenen Spezies

Spezies	Stamm	Referenz	Fragmentgröße				
			Southern Blot				PCR
			<i>PHR1</i> -Sonde		<i>PHR2</i> -Sonde		
			<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	
<i>C. ALBICANS</i>	SC5314	Gillum <i>et al.</i> , 1984	3,7kb	8kb	7,5kb	1kb	1,6kb
	CA019	Kurzai <i>et al.</i> , 1999	3,7kb	8kb	nd <sup>3</sup>	nd	1,6kb
	CA024	Kurzai <i>et al.</i> , 1999	3,7kb	8kb	nd	nd	1,6kb
	132A	Gallagher <i>et al.</i> , 1992	3,7kb	8kb	nd	nd	1,6kb
	3153	Odds, 1974	3,7kb	8kb	nd	nd	1,6kb
<i>C. stellatoidea</i>	ATCC <sup>1</sup> 11006		3,7kb	8kb	7,5kb	1kb	1,6kb
	ATCC 20408		3,7kb	8kb	nd	nd	1,6kb
<i>C. dubliniensis</i>	CBS <sup>2</sup> 7987		6,5kb	7kb	20	0,8	ns <sup>4</sup>
	CBS 7988		6,5kb	7kb	20	0,8	ns
	CD33	Sullivan <i>et al.</i> , 1995	6,5kb	7kb	nd	nd	ns
	CD38	Sullivan <i>et al.</i> , 1995	6,5kb	7kb	nd	nd	ns
	CM1	Sullivan <i>et al.</i> , 1995	6,5kb	7kb	nd	nd	ns
	LP	Kurzai <i>et al.</i> , 1999	6,5kb	7kb	nd	nd	ns
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90876		ns	ns	12	7,5	0,7
<i>C. tropicalis</i>	CBS 94		5,5kb	14kb	7,5	13	ns
<i>C. parapsilosis</i>	CBS 604		11kb	13kb	ns	ns	ns
<i>Issatchenkia orientalis</i> <sup>5</sup>	CBS 673		ns	ns	ns	ns	2,1
<i>Pichia guilliermondii</i> <sup>6</sup>	CBS 566		ns	ns	ns	ns	ns
<i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> <sup>7</sup>	CBS 834		ns	ns	ns	ns	2,2
<i>C. maltosa</i>	CBS 5611		ns	ns	nd	nd	2,2

<sup>1</sup>) ATCC = American Type Culture Collection; <sup>2</sup>) Centralbureau voor Schimmelcultures; <sup>3</sup>) nicht getestet; <sup>4</sup>) kein Signal detektiert; <sup>5</sup>) Teleomorph zu *Candida krusei*; <sup>6</sup>) Teleomorph zu *Candida guilliermondii*; <sup>7</sup>) Teleomorph zu *Candida kefyr*;

Bei einigen, wie der *C. albicans* phylogenetisch relativ nahestehenden Art *C. tropicalis*, zeigten sich positive Signale. Diese waren jedoch deutlich schwächer als die bei *C. albicans* und *C. dubliniensis* detektierten. Sie könnten auf die Existenz PHR homologer Sequenzen im Genom dieser Arten hinweisen. Insbesondere für *C. glabrata* wurden solche Gene bereits beschrieben (Weig *et al.*, 2001). Bei einigen der non-*albicans* Spezies ergaben sich auch in der PCR mit OK3 / OK4 Amplifikationsprodukte (Tab. 1).

### III.1.3. Expressionsmuster der PHR-homologen Gene bei *Candida dubliniensis*

PHR homologe Gene wurden bereits in etlichen Pilzspezies beschrieben. (Vai *et al.*, 1991; Nakazawa *et al.*, 1998; Nakazawa *et al.*, 2000; Mouyna *et al.*, 2000; Weig *et al.*, 2000). *PHR1* und *PHR2* unterscheiden sich jedoch von allen anderen Genen dieser Familie durch die einzigartige Regulation ihrer Expression in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung (Mühlschlegel *et al.*, 1998).

Genomische RNA von *C. dubliniensis* wurde nach Induktion sowohl bei pH 4 als auch bei pH 8 isoliert und geblotet. Die Hybridisierung mit *PHR1* beziehungsweise *PHR2* spezifischen Sonden detektiert jeweils spezifisch ein Transkript eines putativen homologen Gens. (Abb. 5). Dabei wird das zu *PHR1* homologe Transkript nur bei alkalischen pH-Bedingungen induziert und detektiert, während sich das *PHR2* homologe Transkript nur unter sauren pH-Bedingungen findet (Abb. 5).

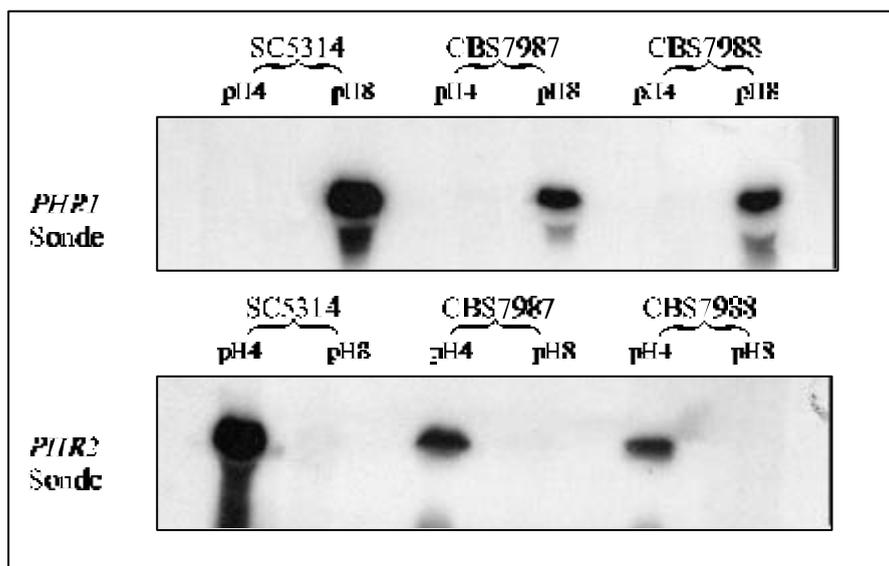


Abb. 5: pH-abhängige Expression der *C. dubliniensis* PHR Homologen

Im Northern Blot zeigt sich für die *C. dubliniensis* PHR Homologen eine identische pH-abhängige Regulation wie für *PHR1* und *PHR2*.

Nicht nur die Existenz zweier homologer Gene aus der PHR Familie, sondern auch deren spezifische Regulation durch den externen pH Wert ist also zwischen den beiden Spezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* konserviert.

#### III.1.4. Sequenzierung von *CdPHR1* und *CdPHR2*

Die PHR homologen Gene *CdPHR1* und *CdPHR2* wurden in einem kombinierten Ansatz aus herkömmlicher und inverser PCR isoliert und sequenziert. Mit Hilfe der Primer *PHR1*-P1 und *PHR1*-3, die von der bekannten *PHR1*-Sequenz abgeleitet wurden, konnten 2.2 kB genomischer Information von *C. dubliniensis* CBS7987 amplifiziert werden (Heinz *et al.*, 2000). Diese enthalten 5' nicht kodierende Sequenzen, also putative Promotorinformation, sowie kodierende Abschnitte. Die restliche Sequenz von *CdPHR1* wurde mittels inverser PCR bestimmt. Zur Durchführung der inversen PCR wurde die als Vorlage dienende genomische DNA dergestalt verdaut, dass die gewünschte Sequenzinformation auf einem DNA Segment liegt, das durch Ligation der beiden Enden in eine zirkuläre Form überführt werden kann. Zur Identifizierung eines geeigneten Enzyms wurde *C. dubliniensis* genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, die eine bekannte Schnittstelle im mittleren Bereich des bekannten offenen Leserasters besitzen und keine weitere im bekannten 5'-liegenden Sequenzbereich liegende Schnittstelle besitzen, verdaut und im Southern Blot auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde, die nur 5' von der bekannten Schnittstelle des jeweiligen Restriktionsenzymes liegende Sequenzinformationen beinhaltet. Damit werden durch die Hybridisierung solche DNA Fragmente identifiziert, die bekannte Information vom Beginn des offenen Leserasters von *CdPHR2* (5' von der Restriktionsschnittstelle) enthalten, sowie weitere, 5' folgende, unbekannte Sequenzinformation bis zur nächsten Schnittstelle des gewählten Restriktionsenzym. Fragmente mit einer Länge um 5kb enthalten ausreichende Sequenzinformation zur Identifizierung des Promoterbereiches und sind von ihrer Größe her gut zur erforderlichen Religation mit Bildung zirkulärer DNA Elemente geeignet. Als geeignetes Restriktionsenzym im Falle von *CdPHR1* diente *Xmn1* (Heinz *et al.*, 2000). Aus der zusammengesetzten Sequenzinformation der aus der PCR bekannten Sequenz und der in dieser inversen PCR erhaltenen zusätzlichen Information ließen sich die Primer *PHR1*-P2 und *PHR1*-H1 ableiten, die ein 3.0kB großes Fragment aus genomischer DNA von *C. dubliniensis* amplifizieren (Heinz *et al.*, 2000). Die Sequenzanalyse zeigt ein durchgängiges offenes Leseraster von 1653 bp, das für ein 551 AS langes Protein kodiert. Die kodierende Sequenz von

*CdPHR1* ist hoch homolog zu *PHR1* mit einem Unterschied von 9,5%, der relativ gleichmäßig über das gesamte Leseraster verteilt ist.

Das komplette offene Leseraster von *CdPHR2* zusammen mit 3' folgender, nicht kodierender Sequenzinformation konnte in einer PCR mit den Primern *PHR2*-1 und *PHR2*-19 mit genomischer DNA von *C. dubliniensis* CBS7987 als Template amplifiziert werden (Heinz *et al.*, 2000). Die übrige Sequenz wurde analog zur *CdPHR1* mittels inverser PCR bestimmt. Dabei erwies sich *HindIII* als geeignet zur Restriktion der genomischen DNA. Aus der erhaltenen Sequenzinformation ließen sich die Primer *PHR2*-P2 und *PHR2*-S1 ableiten, die ein 2,5 kb großes Fragment mit dem gesamten offenen Leseraster sowie 400 bp Promoterinformation enthalten (Heinz *et al.*, 2000). Die Sequenzinformation von *CdPHR2* unterscheidet sich in klustalen Alignments um 8.3% von *PHR2*.

### **III.2. Funktionelle Charakterisierung von *CdPHR1* in *C. albicans***

Die funktionelle Charakterisierung eines Gens erfolgt klassischerweise durch Charakterisierung der Deletionsmutante sowie des Phänotyps, der durch eine Überexpression des Gens erzeugt wird. Die Deletion von Genen in *C. albicans* wird durch eine als URA Blaster bekannte Technik, die von Fonzi und Irwin beschrieben wurde, erreicht (Fonzi und Irwin, 1993). Bei *C. dubliniensis* konnte diese Technik zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit nicht angewendet werden, da bislang keine auxotrophen Mutanten beschrieben sind. Aufgrund der hohen Homologie der *CdPHR* Gene mit ihren *C. albicans* Äquivalenten und der Verfügbarkeit phänotypisch wie genotypisch exzellent charakterisierter *PHR*-Deletionsmutanten wurde daher ein anderer Weg zur funktionellen Charakterisierung von *CdPHR1* beschritten. Durch die Komplementation einer *PHR1* Deletionsmutante mit *CdPHR1* wird eine funktionelle Äquivalenz der beiden Gene hochwahrscheinlich.

#### **III.2.1. Komplementation der *PHR1* Deletion mit *CdPHR1***

Die Komplementation der *PHR1* Deletion durch *CdPHR1* wurde durch Integration des Plasmids pWH11 in das Genom der *C. albicans*  $\Delta phr1$  Mutante CAS8 erreicht. Um pWH11 zu konstruieren, wurde ein 3,0 kp langes Segment, welches das gesamte offene Leseraster von *CdPHR1* sowie 1073 bp 5' Sequenz und 327bp 3' Sequenz enthält, mit den Primern *PHR1*-P2 und *PHR1*-H1 von genomischer DNA des Referenzstammes *C. dubliniensis* CBS7987 amplifiziert (Heinz *et al.*, 2000). Diese Primer fügen dem Amplifikat eine 5' gelegene singuläre *PstI*

Schnittstelle sowie eine 3'gelegene *Hind*III Schnittstelle an. Das PCR Produkt wurde anschließend in den kommerziell erhältlichen Vektor pCR2.1 kloniert und so der Vektor pCR-*PHR1*-CD generiert (Heinz *et al.*, 2000). Dieser wurde anschließend in *E. coli* transformiert (Topo TA Kloning Kit). Die Sequenzierung der im Vektor eines zufällig ausgewählten, positiv transformierten Klons enthaltenen Insertion ergab 100% Übereinstimmung zur beschriebenen Sequenz von *CdPHR1*. Somit war die Einführung etwaiger Punktmutationen durch die PCR Amplifikation ausgeschlossen. *CdPHR1* wurde im Anschluss aus dem aufgereinigten Plasmid pCR-*PHR1*-CD durch einen konsekutiven Verdau mit *Pst*I und *Hind*III wieder ausgeschnitten und in den Vektor pFM5 kloniert (Heinz *et al.*, 2000). pFM5 enthält ein stumpfendiges 3,85 kB *C. albicans URA3 Xba*I Fragment, welches das gesamte *URA3* Gen sowie benachbarte Sequenzabschnitte aus dem *URA3* Locus enthält, in der *Sma*I Schnittstelle des kommerziell erhältlichen Plasmids pBSK(+) (Mühlschlegel und Fonzi, 1997). Zusätzlich enthält pFM5 ein 0,75kb großes *Eco*RI-*Nla*III Promotorsegment des *C. albicans TEF2* Gens, das stumpfendig in die *Eco*RV Schnittstelle des Plasmids ligiert wurde (Mühlschlegel und Fonzi, 1997). Dieses Segment wird durch den der Integration von *CdPHR1* in den Vektor vorangehenden *Pst*I-*Hind*III Verdau aus dem Vektor ausgeschnitten und ist daher in pWH11 nicht enthalten (Abb. 6a).

### III.2.2. Transformation der knock out Mutante CAS 8

Zur Integration ins *C. albicans* Genom wurde pWH11 an der singulären *Hpa*I Schnittstelle 3' des *URA3* Locus außerhalb des offenen Leserasters von *URA3* linearisiert und mittels Spheroplastentransformation in CAS8 transformiert (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Heinz *et al.*, 2000, Abb. 6). Bei Integration des Plasmids verliert dieser Stamm seine Uridin Auxotrophie (Abb. 6). Transformanten wurden daher auf uridinfreien YNB Platten selektioniert, die auf den für CAS8 nicht restriktiven pH 4 eingestellt waren (Heinz *et al.*, 2000; Abb. 6). Damit spielt die Expression von *CdPHR1*, ob vorhanden oder nicht, keine Rolle für die Selektion der Transformanten. In einem zweiten Schritt wurden Uridin-prototrophe Transformanten auf Platten mit dem für CAS8 restriktiven pH 8 replika-plattiert und auf normales Wachstum bei diesem pH getestet (Heinz *et al.*, 2000). Insgesamt wurden 50 Transformanten aus zwei unterschiedlichen Transformationsansätzen untersucht (Heinz *et al.*, 2000). Alle 50 Transformanten zeigten ein normales Wachstum bei pH 8 sowie einen normalen mikroskopischen Phänotyp (Heinz *et al.*, 2000, Abb. 7). Dies steht im Gegensatz zu dem ballonierten abnormen Phänotyp von CAS8 bei pH8 (Abb. 7).

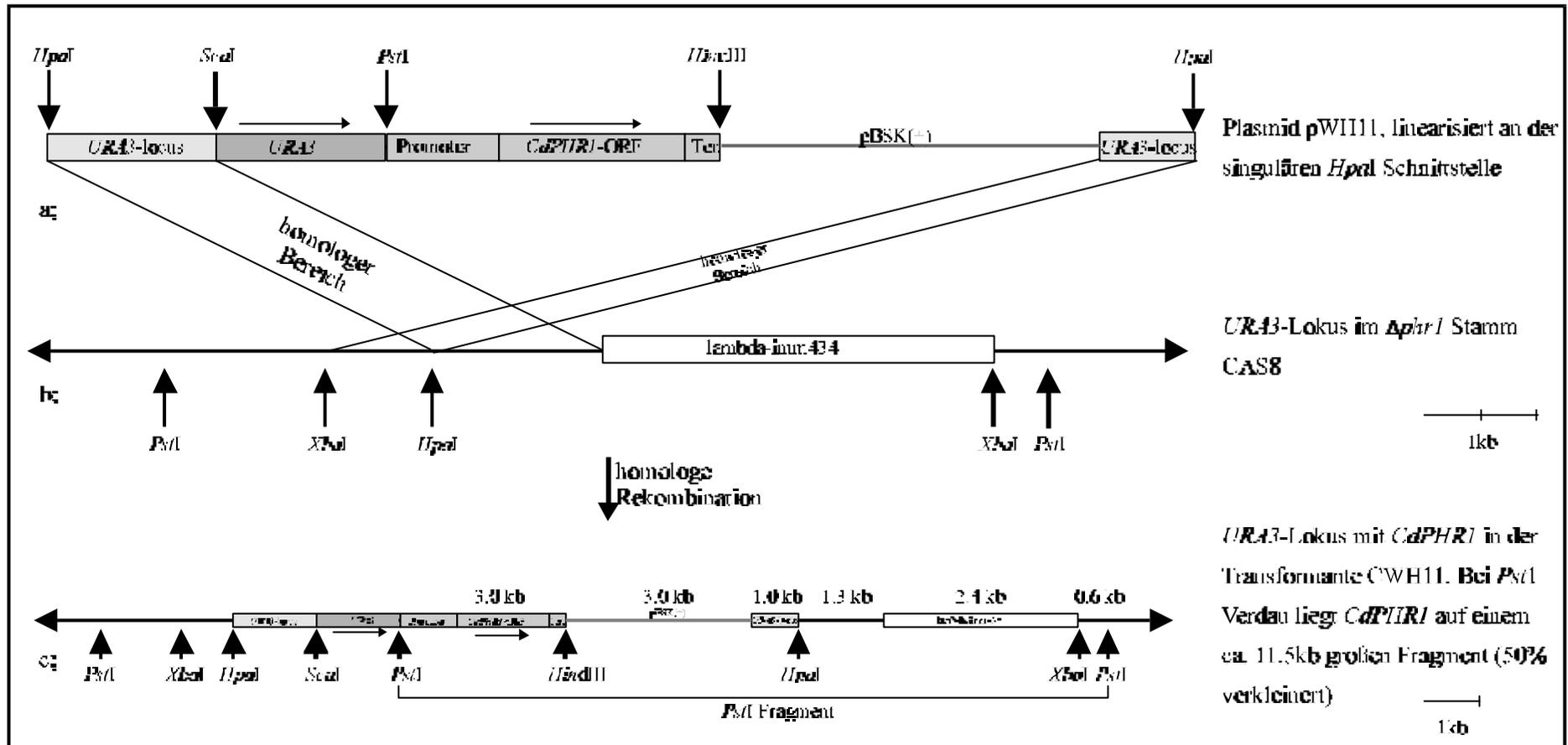
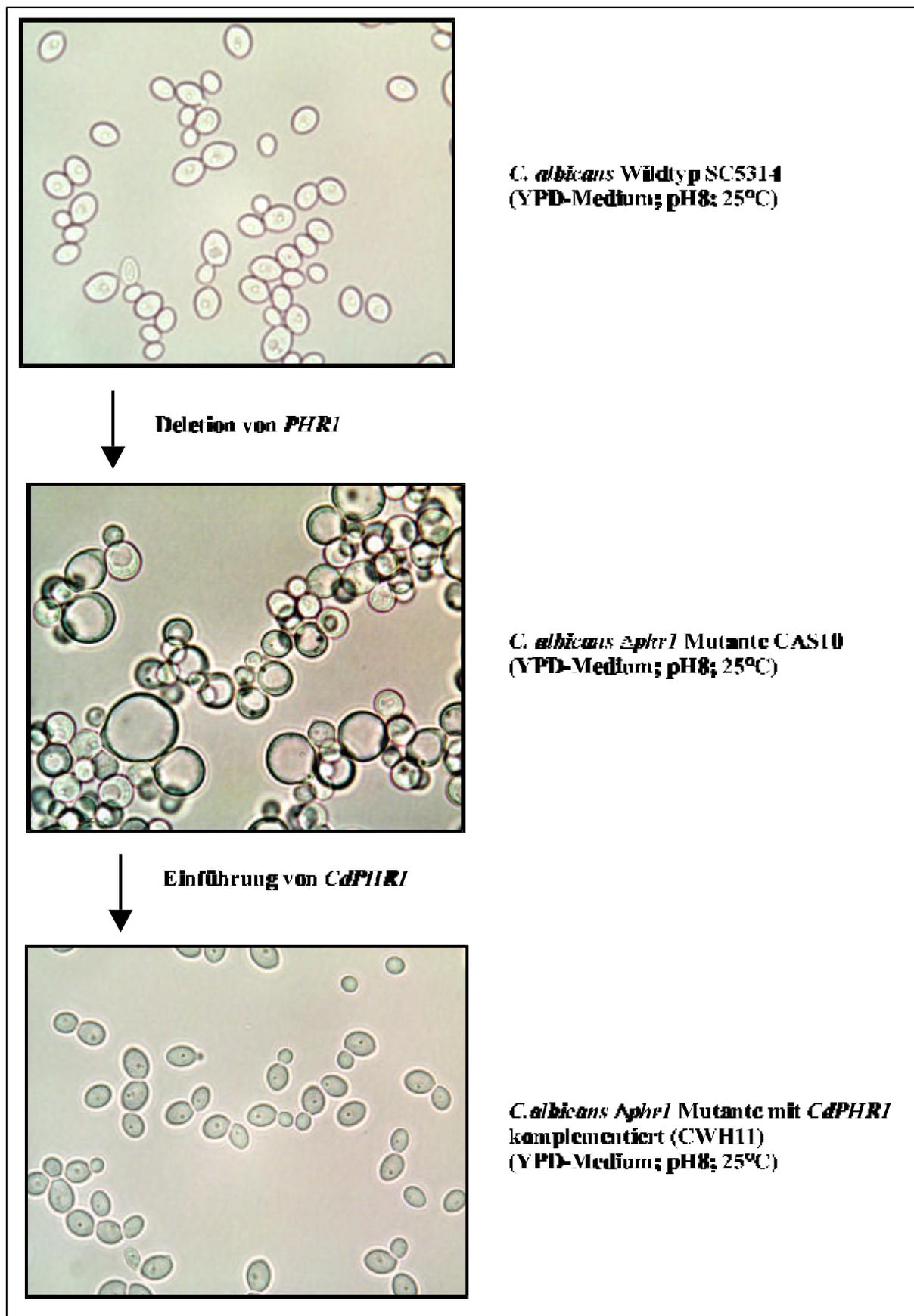


Abb. 6: Transformation von CAS8 (*Dphr1*, *Dura3*) mit pWH11

- pWH11 wird an der singulären *HpaI* Schnittstelle linearisiert.
- am *URA3*-Lokus des  $\Delta ura3 \Delta phr1$  Stammes CAS8 ist *URA3* durch ein *lambda-imm434* Fragment ersetzt. Flankierende, nicht kodierende Sequenzen sind homolog zu den *URA3*-Lokus Sequenzen in pWH11. Dies ermöglicht homologe Rekombination.
- nach einer erfolgreichen Integration von pWH11 an den *URA3*-Lokus von CAS8 entsteht eine *URA3*<sup>+</sup>, *CdPHR1*<sup>+</sup> Transformante (CWH11). Nach einem *PstI* Verdau genomischer DNA dieser Transformante befindet sich *CdPHR1* auf einem circa 11,5 kb großen Fragment. Der Nachweis dieses Fragmentes ermöglicht die Bestätigung einer korrekten, singulären Integration.



**Abb. 7: Phänotypische Komplementation der Deletion von *PHR1* mit *CdPHR1* in *C. albicans***

### III.2.3. Genotypische Charakterisierung der Transformanten

Genomische DNA von neun Uridin prototrophen Transformanten wurde zur Bestätigung der korrekten Integration von pWH11 am *URA3* Locus von CAS8 im Southern Blot weiter charakterisiert. Ein kompletter *PstI* Verdau dieser genomischen DNA wurde mit der *PHR1* Sonde hybridisiert. Sieben der so untersuchten Transformanten zeigten eine singuläre circa 11,5kb große Bande, entsprechend einer singulären Integration von pWH11 am *URA3* Locus (Abb. 6; Abb. 8 Spalte 2). Bei einer Transformanten fand sich eine zusätzliche Bande in der Größe des Plasmids pWH11, entsprechend einer möglichen duplizierenden Tandemintegration (Abb. 8 Spalte 1). Für die letzte Transformante fand sich ein komplexes, durch einfache Integration nicht erklärbares Hybridisierungsmuster. Eine Transformante mit singulärer Integration des Konstruktes, im Folgenden CWH11 genannt, wurde für weitere Analysen als repräsentativ betrachtet.

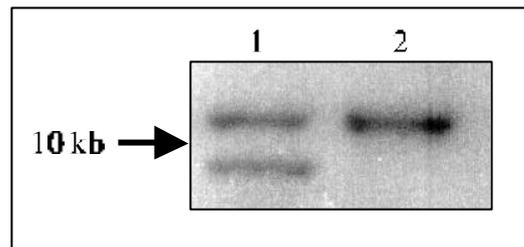


Abb.8: Integration von pWH11 in CAS8

Die circa 11.5kb große Bande in Spalte 2 (DNA von CWH11) entspricht einer korrekten Integration von pWH11. Eine zusätzliche Bande entsteht durch Tandemintegration (Spalte 1)

### III.2.4. Expression von *CdPHR1* in *C. albicans*

Wie beschrieben führte die Integration einer einzelnen Kopie von *CdPHR1* zur vollständigen Reversion des aberranten Phänotyps der  $\Delta phr1$  Mutante CAS8 unter alkalischen und neutralen pH-Bedingungen (Abb. 7). Damit kann eine funktionelle Homologie von *PHR1* und *CdPHR1* angenommen werden. Von zusätzlichem Interesse ist die Frage nach der Regulation der Expression von *CdPHR1* unter Kontrolle seines nativen Promotors in *C. albicans*. Zur Untersuchung dieser Frage wurde RNA der Transformante CWH11 nach Induktion bei pH 4 und pH 8 isoliert. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit der *CdPHR1* Sonde. Dabei zeigte sich das bekannte, pH-abhängige Expressionsmuster von *CdPHR1* (Abb. 9). Damit bleiben sowohl die Funktion als auch die transkriptionelle Regulation von *CdPHR1* in *C. albicans* erhalten. Die pH-abhängige Regulation von *CdPHR1* ist weiterhin unabhängig von der genomischen Lokalisation des Gens, das ja in der Transformante am *URA3* Genlocus integ-

riert ist. Dies zeigt, dass 1 kb 5' des offenen Leserasters von *CdPHR1* liegender Information ausreichend ist, um die transkriptionelle Regulation zu gewährleisten.

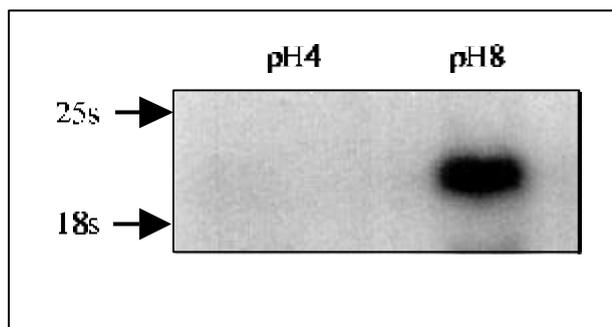


Abb. 9: Northern Blot von *CWH11*

Es zeigt sich eine pH-abhängige Expression von *CdPHR1* unter Kontrolle seines nativen Promotors in *C. albicans* am *URA3*-Lokus

### III.3. Funktionelle Charakterisierung von *CdPHR1* in anderen Spezies

#### III.3.1. Reversion der *S. cerevisiae* *GAS1* Deletionsmutante Wb2d

Der Verlust von *GAS1*, einem PHR homologen Gen bei *S. cerevisiae*, führt zu einem Phänotyp mit konglomerierten Zellen und atypischer Knospungsmorphologie (Vai *et al.*, 1991, Abb. 10). Dieser Phänotyp ist entsprechend der konstitutiven Expression von *GAS1* nicht vom pH Milieu der Umgebung abhängig. Wie bereits erwähnt, besitzt auch Gas1 eine  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase Aktivität *in vitro* und weist die typischen Charakteristika der PHR Genfamilie auf (Mouyna *et al.*, 2000). Das bereits zur Komplementation der *PHR1* Deletion verwendete *CdPHR1* Gen unter Kontrolle seines nativen Promotors wurde nun auch in die *GAS1* Deletionsmutante Wb2d eingeführt. Dabei waren vor allem von Interesse ob *CdPHR1* den Phänotyp der *GAS1* Deletion revertieren kann und ob die Expression von *CdPHR1* auch in *S. cerevisiae* durch die externen pH-Bedingungen kontrolliert wird.

Zur Klärung dieser Fragen wurde das bereits beschriebene *CdPHR1* Fragment in einem *Hind*III Verdau aus pCR-*CdPHR1* ausgeschnitten. Dieses 2,6 kb große Fragment wurde an der singulären *Hind*III Schnittstelle in den *S. cerevisiae* CEN/ARS Vektor pRS316 kloniert (Sikorski und Hieter, 1989). Der resultierende Vektor wird im Folgenden pSC1 genannt. pSC1 wurde mittels der Lithiumacetat - Methode in Wb2d transformiert. Dabei diente die Komplementation der Uracil Auxotrophie als Selektionsmarker. Zehn unabhängige Transformanten zeigten einen mikroskopisch normalen Phänotyp, unabhängig vom pH-Wert des Testmediums (Abb 10).

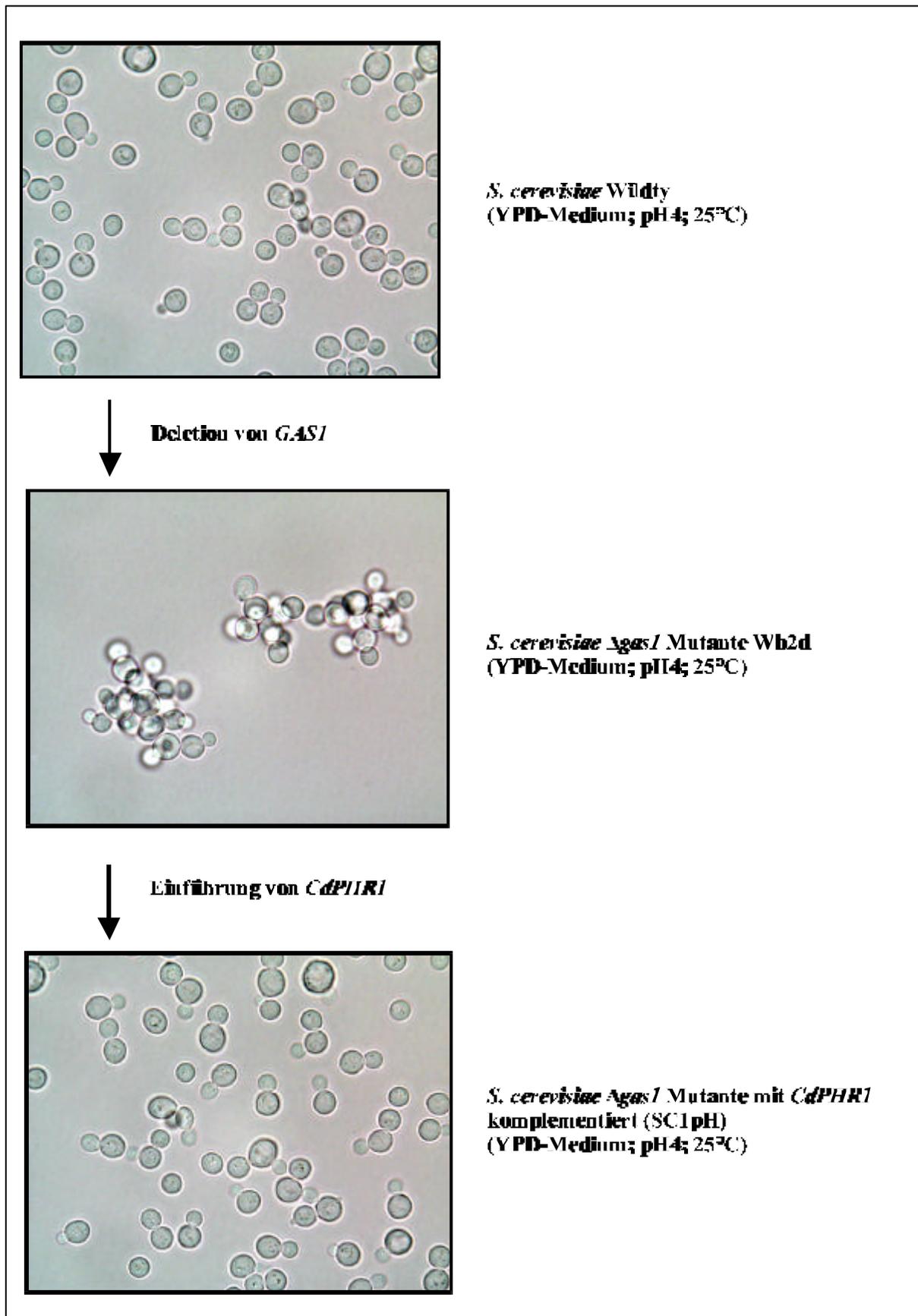


Abb. 10: Phänotypische Komplementation der Deletion von *GAS1* mit *CdPHR1* in *S. cerevisiae*

Ein repräsentativer Klon, im Folgenden als SC1ph bezeichnet, wurde im Northern Blot weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurde RNA bei pH 4 und pH 8 isoliert und mit der *CdPHR1*-Sonde hybridisiert. Für beide pH-Werte konnte ein deutliches Signal der erwarteten Größe von ca. 1,6 kb detektiert werden (Abb. 11). Dies entspricht dem Ergebnis eines parallel durchgeführten Experimentes, in dem *PHR2* mittels pRS316 in Wb2d eingeführt wurde. In einem Kontrollstamm, der lediglich mit dem leeren Vektor pRS316 transformiert wurde, wurde dagegen wie erwartet kein Signal detektiert. Aufgrund der Tatsache, dass exakt dasselbe Fragment in *C. albicans* hinreichend für eine pH-regulierte Expression war, zeigt sich, dass zwar die Funktion, nicht jedoch die transkriptionelle Regulation von *PHR1-CD* in *S. cerevisiae* konserviert ist.

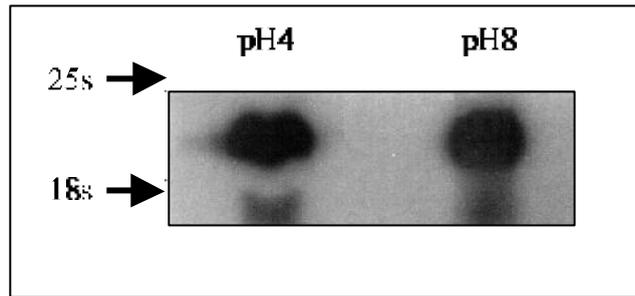


Abb. 11: Expression von *CdPHR1* in *S. cerevisiae*

Northern Blot mit totaler RNA, die unter sauren oder alkalischen Induktionsbedingungen isoliert wurde. Es zeigt sich eine pH-unabhängige Expression von *CdPHR1* in *S. cerevisiae*.

### III.3.2. Aktives *RIM101* ermöglicht keine pH-regulierte Expression von *CdPHR1* und *PHR2* in *S. cerevisiae*

Um zu überprüfen, inwieweit die konstitutive Expression von *CdPHR1* und *PHR2* in *S. cerevisiae* durch die zusätzliche Einführung des regulierenden *C. albicans* Transkriptionsfaktors *RIM101* zu durchbrechen ist, wurde ein wildtypisches (*RIM101*-31; El Barkani *et al.*, 2000b) und ein dominant aktives Allel (*RIM101*-16; El Barkani *et al.*, 2000b) von *RIM101* zusätzlich in die PHR-tragenden *S. cerevisiae* Stämme eingebracht.

Zu diesem Zweck wurden beide Allele in den *S. cerevisiae* Vektor pFL45S kloniert (Christianson *et al.*, 1992). Dieser Vektor trägt das *S. cerevisiae* *TRP1* Gen zur Komplementierung einer Tryptophanuxotrophie als Selektionsmarker. *RIM101*-16 und *RIM101*-31 wurden aus den entsprechenden Vektoren pEM25-16 und pEM25-31 durch einen konsekutiven *Bam*H1 / *Eco*RV Verdau geschnitten (El Barkani *et al.*, 2000b). pFL45S wurde konsekutiv mit *Sma*I / *Bam*H1 an singulären Schnittstellen verdaut und dephosphoryliert. In die so präparierten Vektoren wurden *RIM101*-16 beziehungsweise *RIM101*-31 zur Generierung von p16 und p31 kloniert. Die gewünschte Insertion wurde durch *Bam*H1-Linearisierung der Vektoren bestätigt, bei der sich die erwartete Größe von 7,1kb (4,0kB Vektor, 3,1kB Insertion) zeigt. Die

Plasmide p16 und p31 wurden dann in die *S. cerevisiae* Stämme SC1pH und SC2pH mittels Elektroporation transformiert und so die Stämme SC1pH-16, SC1-pH-31, SC2pH-16 und SC2pH-31 generiert. Zusätzlich wurde als Kontrolle der leere Vektor pFL45S in SC2pH transformiert (Stamm SC2pH-0).

Phänotypisch zeigte sich keine Veränderung der transformierten Stämme. Im Northern Blot lies sich außerdem keine Veränderung der Expressionsmuster von *PHR2* und *CdPHR1* beobachten. Dies traf sowohl für die Stämme mit dem Wildtyp-Allel, als auch für die mit dem dominant aktiven Allel RIM101-16 zu.

### III.3.3. Transformation von *C. glabrata*

*C. glabrata* ist eine eng mit *S. cerevisiae* verwandte Spezies, die jedoch von zunehmender pathogener Bedeutung ist (Fridkin und Jarvis, 1996). Im Genom der stets haploiden Hefe *C. glabrata*, für die kein Teleomorph bekannt ist, finden sich zumindest drei PHR homologe Gene (Weig *et al.*, 2001).

Um zu testen, inwieweit der *CdPHR1* Promotor in *C. glabrata* funktional ist, wurde der beschriebene Vektor pSC1 mittels der Lithium-Acetat Methode in *C. glabrata* 2001HTU transformiert. Dabei wird die Möglichkeit ausgenutzt, eine *C. glabrata*  $\Delta$ *ura3* Mutante durch Einführung des *S. cerevisiae* *URA3* Gens in ihrer Auxotrophie zu komplementieren. In der nachfolgenden Southern Blot Analyse einer Transformante zeigt sich das erwartete Signal für *CdPHR1*. Im Northern Blot konnte jedoch keine Expression von *CdPHR1* nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen bei einem parallelen Experiment, in dem *C. albicans* *PHR2* auf einem *C. glabrata* Vektor (pACT14) in denselben Stamm transformiert wurde. Auch hier konnte im Northern Blot keine Expression nachgewiesen werden. Damit erscheint der *CdPHR1* Promotor in *C. glabrata* nicht funktional.

### III.3.4. Transformation von *Aspergillus nidulans*

Der Schimmelpilz *A. nidulans* ist ein Saprophyt mit allenfalls geringer humanpathogener Bedeutung und einer gut charakterisierten pH-regulativen Kaskade um den Transkriptionsfaktor PacC.

*CdPHR1* wurde unter Kontrolle seines nativen Promotors in den *A. nidulans* Referenzstamm 197 (Weidner *et al.*, 1997) transformiert. Das bereits beschriebene 3,0 kb große *HindIII* Fragment aus pCR-*PHR1*-CD, das *CdPHR1* unter Kontrolle seines nativen Promotors beein-

haltet und in *C. albicans* pH-abhängige Expression von *CdPHR1* ermöglicht, wurde zu diesem Zweck in die *HindIII* Schnittstelle des integrativen *A. nidulans* Vektors pLYSF1 (Weidner *et al.*, 1997) kloniert. Der resultierende Vektor wurde pSM-3 genannt. Mit diesem Vektor wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Brakhage (Medizinisch Hochschule Hannover) der *A. nidulans* Stamm 197 transformiert und Transformanten auf Lysinprototrophie selektioniert (Ballance und Turner, 1985). Chromosomale DNA von 10 prototrophen Transformanten wurde isoliert und im Southern Blot mit der *CdPHR1*-Sonde hybridisiert. Alle getesteten Transformanten enthielten das *CdPHR1* Gen, allerdings in unterschiedlicher Kopienzahl. Stamm 197PHRL, mit nur ein oder zwei Kopien von *CdPHR1*, sowie Stamm 197PHRH mit multiplen Kopien des Gens wurden im Northern Blot weiter untersucht. Es konnte jedoch unabhängig vom pH-Milieu kein *CdPHR1* Transkript gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Hybridisierung für das als Kontrolle mitgeführte *ipnA* Gen von *A. nidulans*, das für die nur im sauren Milieu exprimierte Isopenicillin-N-synthetase kodiert, das erwartete pH-abhängige Expressionsmuster (Espeso *et al.*, 1993). Damit konnte gezeigt werden, dass der *CdPHR1* Promoter in *A. nidulans* nicht funktional ist und somit auch keine pH-abhängige Regulation des Transkripts zulässt.

### **III.4. Epidemiologische Untersuchungen**

#### **III.4.1. Primer-Design und Vorversuche für ein PCR basiertes Diskriminationsverfahren zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis***

In einem ersten Versuch zur Klonierung der PHR homologen Gene von *C. dubliniensis* wurden Primer von Beginn und Ende der kodierenden Sequenz von *PHR1* abgeleitet, um zu überprüfen, ob die Homologie zwischen beiden Spezies so hoch ist, dass mit Hilfe dieser Primer eine Amplifizierung der *C. dubliniensis* Gene möglich wäre. Es zeigte sich jedoch, dass diese Primer spezifisch das offene Leseraster von *PHR1* amplifizierten (vgl. Kapitel 1.1). Bei der Verwendung von Template DNA von *C. dubliniensis* kam es nicht zur Amplifizierung eines DNA Abschnittes. Um zu testen, ob diese Spezifität auch für einen größeren Pool an Stämmen zu verifizieren ist, wurde die PCR Reaktion mit einer Reihe von sicher klassifizierten Stämmen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde DNA aus 25 klinischen Isolaten präpariert (12 *C. albicans* und 13 *C. dubliniensis*). Bei allen *C. albicans* Stämmen, jedoch bei keinem *C. dubliniensis* Stamm, kam es zur Amplifizierung des bereits beschriebenen Produktes

von 1.6 kb (Abb. 12). Damit zeigte sich das Potenzial dieser PCR zur schnellen Unterscheidung zwischen den beiden Spezies.

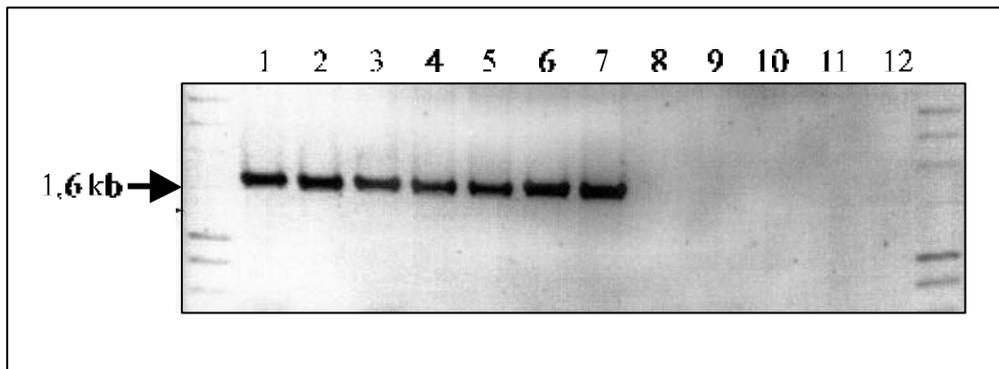


Abb. 12: Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* mittels diagnostischer PCR

Nur bei *C. albicans/stellatoidea* Stämmen (Spalte 1-7, Stämme SC5314, CA019, CA024, 132A, 3153, CBS11006, CBS20408) nicht jedoch bei *C. dubliniensis* Isolaten (Spalten 8-12, Stämme CBS7987, CBS7988, CD33, LP) kommt es zu einer Amplifikation mit den Primern OK3 und OK4

### III.4.2. Protokolloptimierung für die PCR

Zur Optimierung der PCR - Reaktion wurden weitere Versuche durchgeführt. Dabei war maßgebliches Ziel, einen möglichst breiten Bereich an eingesetzter Template DNA nutzen zu können, ohne das Ergebnis zu gefährden. Dies ist von Bedeutung, da das im Hinblick auf Geschwindigkeit optimierte Protokoll zur DNA Isolierung auf genauere Zellzahlmessungen verzichtet und daher die resultierende DNA Menge Schwankungen unterworfen ist.

Wie bereits beschrieben, hatte sich die

PCR auch bei Annealingtemperaturen unterhalb von 50°C (bis 40°C) als speziesspezifisch herausgestellt (Abb. 13). Damit sind geringfügige Schwankungen der Annealingtemperatur kein wesentlicher Störfaktor im Hinblick auf die diagnostische Verwertbarkeit.

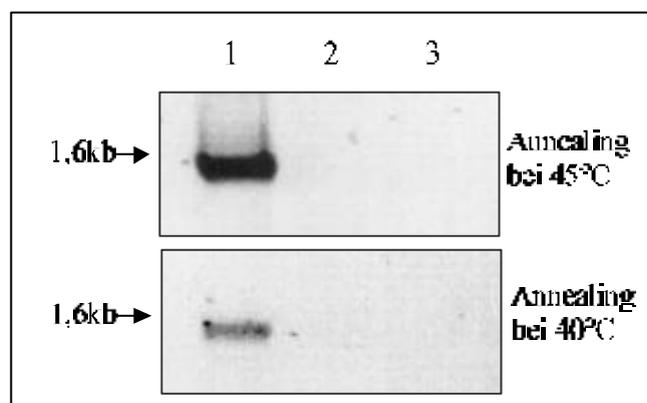


Abb.13: Abhängigkeit der PCR Ausbeute von der Annealingtemperatur

Bei einer Annealingtemperatur von 40°C zeigt sich eine deutlich verringerte Ausbeute bei erhaltener Spezifität.

Demgegenüber wurde die Amplifikation des offenen Leserasters von *PHRI* insbesondere durch zu hohe Mengen an DNA oder Koloniematerial gehemmt beziehungsweise deutlich reduziert.

### III.4.3. Design einer retrospektiv epidemiologischen Studie

Zur Etablierung der beschriebenen PCR als Unterscheidungskriterium zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurde eine epidemiologische Studie zur Bestimmung der Inzidenz von *C. dubliniensis* unter klinischen Isolaten durchgeführt. Gleichzeitig sollten in dieser Studie verschiedene Differenzierungsverfahren zur Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* im Hinblick auf ihr diskriminatives Potential evaluiert werden.

133 klinische Isolate wurden zwischen Mai 1998 und Dezember 1998 gesammelt. 103 davon stammten von Fällen oropharyngealer Candidose und wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover isoliert. Von diesen stammten wiederum 70 Isolate von 45 HIV-positiven Patienten und 33 von 17 Transplantationspatienten (12 Lebertransplantationen, 3 Herztransplantationen und 2 Nierentransplantationen). 30 Isolate von Patientinnen mit vaginaler Candidose wurden im mykologischen Labor des Würzburger Instituts für Hygiene und Mikrobiologie gesammelt. Alle 133 Isolate waren in der routinemäßig durchgeführten mykologischen Diagnostik aufgrund ihrer Fähigkeit, auf Reis-Tween Agar Chlamydosporen auszubilden, als *C. albicans* klassifiziert worden. Bei Mischisolationen wurden nur die chlamydosporenpositiven Isolate in die Studie aufgenommen. Die Klassifizierung der vaginalen Isolate war zusätzlich durch einen Test auf Keimschlauchbildung nach Inkubation in Rinderserum bei 37°C gestützt worden.

Tabelle 2: Verteilung der Isolate in der epidemiologischen Studie

Isolationsort	Patientenkollektiv	Anzahl	davon später identifiziert als:	
			<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Vaginale Isolate <sup>1</sup>	--	30	30	-
Oropharyngeale Isolate <sup>2</sup>	Transplantatempfänger	33	33	-
	HIV-Patienten	70	49	21
		<b>gesamt: 133</b>	<b>gesamt: 112</b>	<b>gesamt: 21</b>

<sup>1</sup>) gesammelt im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg; <sup>2</sup>) gesammelt im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Im Verlauf der Studie wurde von allen 133 Isolaten genomische DNA isoliert und als Template in der beschriebenen diskriminativen PCR verwendet. Die oropharyngealen Isolate wurden dann durch Sequenzierung der V3 Region aus dem 23s rRNA codierenden Gen auf Spezieslevel klassifiziert. Weiterhin wurden die ITS Regionen (**internal transcribed spacer**) sequenziert und phylogenetisch ausgewertet. Die Isolate wurden dann in einer Blindstudie phänotypischen Tests unterzogen. Dabei wurden die Koloniefärbung auf CHROMagar Candida, das Wachstumsverhalten bei 45°C die Chlamyosporenmorphologie auf Reis-Tween Agar und die Koloniemorphologie auf Staib-Agar beurteilt. Die Kohlenhydrat-Assimilationseigenschaften der als *C. dubliniensis* identifizierten Isolate wurden dann im MICRONAUT RC System, einem neuartigen, kommerziell erhältlichen, semiautomatischen Hefe-Identifikationssystem bestimmt. Weiterhin wurden alle oropharyngealen Isolate auf ihre Sensibilität gegen Fluconazol, Itraconazol und Amphotericin B getestet (Tab. 3).

Tabelle 3: *Aufbau der epidemiologischen Studie*

<b>1. Molekulare Klassifizierung</b>	- V3 rDNA Sequenzierung - ITS Sequenzierung - Diskriminative PCR
<b>2. Morphologische Tests</b>	- Chlamyosporenmorphologie - Wachstumsverhalten bei 45°C - Koloniefärbung auf CHROMagar - Chlamyosporenbildung auf Staibagar
<b>3. Biochemie</b>	- MICRONAUT RC System
<b>4. Resistenztestungen</b>	- Fluconazol - Itraconazol - Amphotericin B

#### III.4.4. Molekulare Klassifizierung der Isolate

Die zuvor beschriebene diskriminative PCR führt bei *C. albicans* Isolaten zur Amplifizierung von 1kb des offenen Leserasters von *PHR1*. Im Gegensatz dazu findet sich bei *C. dubliniensis* kein Amplifikationsprodukt. Genomische DNA von allen 133 Isolaten wurde in der PCR als Template verwendet. Bei 112 Isolaten zeigte sich ein Amplifikationsprodukt von 1kb, während es bei 21 Isolaten nicht zu einer Amplifikation kam. Die PCR negativen Isolate waren

dabei ausschließlich der Gruppe der oropharyngealen Isolate von HIV-Patienten zuzuordnen. Diese Isolate waren damit präsumptiv als *C. dubliniensis* identifiziert.

Die V3 Region der 23s rDNA ist innerhalb der Spezies *C. albicans* hoch konserviert und zeigt auf einer Länge von 600bp nur einzelne Basenaustausche. Im Gegensatz dazu wurde bereits bei der Erstbeschreibung von *C. dubliniensis* gezeigt, dass diese Region in ca. 14bp von der *C. albicans* Sequenz differiert. Um die Isolate der Studie eindeutig zu klassifizieren, wurden 600bp dieser Region von jedem Isolat in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. 21 Isolate von 14 Patienten konnten so als *C. dubliniensis* identifiziert werden, während die anderen 112 Isolate der Spezies *C. albicans* zuzuordnen waren (Tab. 2). Alle als *C. dubliniensis* identifizierten Isolate hatten ein negatives PCR Ergebnis gezeigt, während die DNA von allen *C. albicans* Isolaten zu der erwarteten Amplifikation des 1kb Fragmentes geführt hatte. Die diskriminative PCR war damit auch an einer größeren Stichprobe nicht präklassifizierter Stämme als valider Test zur Differenzierung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* bestätigt worden. Alle *C. dubliniensis* Isolate stammten aus oropharyngealen Abstrichen HIV-positiver Patienten, innerhalb dieser Gruppe errechnete sich die Prävalenz von *C. dubliniensis* mit 30%. Diese Zahl war nicht durch Mehrfachisolierungen von einzelnen Patienten beeinflusst.

#### **III.4.5. Die ITS Sequenzen von *C. albicans* und *C. dubliniensis***

DNA Regionen, die für 18s, 5,8s und 25s rRNA kodieren, sind einer nur sehr langsamen Evolution unterworfen und daher im gesamten Spektrum der Pilze hoch konserviert. Dagegen befinden sich zwischen diesen kodierenden Regionen die sogenannten internen transkribierten Spacerregionen ITS1 und ITS2 von einigen hundert Basenpaaren Länge. Diese Regionen zeigen aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes eine weitaus höhere Variabilität als die kodierenden Bereiche. Aufgrund der Möglichkeit, die internen transkribierten Spacerregionen in einer PCR mit Primern zu amplifizieren, die aus den hochkonservierten benachbarten rRNA kodierenden Bereichen abgeleitet und daher für ein sehr weites Spektrum an Pilzen verwendbar sind, eignen sich diese Regionen besonders gut für phylogenetische Analysen (Guarro *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000).

Mittels zweier Primerpaare wurden die ITS Regionen aller *C. dubliniensis* Stämme in dieser Studie amplifiziert. Zum Vergleich erfolgte die Amplifizierung der ITS Sequenzen von 35 zufällig ausgewählten oropharyngealen *C. albicans* Isolaten. Für alle diese Stämme wurden die ITS1 und die ITS2 Region unter direkter Verwendung des PCR Produktes nach einer Li-

thium Acetat Fällung sequenziert. Um fehlerhafte Sequenzierergebnisse durch Kontamination des PCR Produktes mit dem jeweils nicht zur Sequenzierung verwendeten gegenseitigen Primer zu vermeiden, wurde die Primerkonzentration in der PCR auf 0.1pmol/μl minimalisiert. In allen Fällen erfolgte eine zweiseitige Sequenzierung und anschließendes gegenläufiges Alignment der Sequenzen. Aufgrund der hohen Konservierung der zwischen den beiden ITS Sequenzen positionierten und damit in der Sequenzierung vollständig miterfassten 5,8s rDNA, war das Ergebnis der Sequenzierung zusätzlich durch den Abgleich einer internen Kontrollsequenz abgesichert.

Der zwischen 28s und 5,8s rDNA positionierte ITS1 Bereich wies bei 28 von 35 untersuchten *C. albicans* Isolaten in dieser Studie eine Länge von 139 bp auf, während derselbe Bereich bei allen *C. dubliniensis* Isolaten 138bp lang war. Im Alignment errechnete sich eine Diversität von 6,7% zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* Sequenzen. Die zugrundeliegenden Unterschiede finden sich vor allem im 3' Bereich der ITS1 Region. Zwischen den Positionen 30 und 40 der ITS1 Region findet sich auf kleinem Raum eine hohe Diversität. Dieser Bereich wurde auch in späteren Arbeiten identifiziert und als speziesspezifische Signalsequenz bezeichnet (Tintelnot *et al.*, 2000). Innerhalb der *C. albicans* Stämme findet sich lediglich an Position 131 eine Variabilität. Hier weisen 7 der untersuchten *C. albicans* Stämme ein Nukleotid zusätzlich zur Sequenz des Referenzstammes SC5314 auf. Bei 5 von diesen Stämmen handelt es sich um Thymin, entsprechend der Sequenz des *C. dubliniensis* Referenzstammes CBS7987. Bei den anderen beiden findet sich hier Adenosin. Diese 7 Stämme besitzen damit eine ITS Sequenz von 140bp Länge. Mit Ausnahme des Isolates HD19, bei dem sich auf Position 83 Cytosin statt Thymin findet, sind alle *C. dubliniensis* Isolate in dieser Studie 100% homolog bezüglich ihrer ITS1 Sequenz.

Interessanterweise weicht dieses Isolat auch in der ITS2 Sequenz als einziges *C. dubliniensis* Isolat vom Konsensus ab und differiert auch hier an einer Position von den restlichen *C. dubliniensis* Stämmen. Die ITS2 Region ist mit 151bp bei *C. albicans* (bei Isolat HA38 152bp) und 156bp bei *C. dubliniensis* etwas länger als die ITS1 Region. Der Unterschied zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* ist mit 11% im klastalen Alignment höher als für die ITS1 Sequenz. An Position 138 (gezählt ist die Konsensussequenz) der ITS2 Region zeigt sich eine Variabilität innerhalb der Gruppe von *C. albicans* Isolaten, von denen 11 inklusive des Referenzstammes SC5314 Thymin und die restlichen 24 Cytosin aufweisen.

Insgesamt zeigten sich beide ITS Sequenzen zwar gut geeignet zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*, allerdings zeigte sich innerhalb einer Spezies eine hohe Ho-

mogenität, so dass eine weitergehende phylogenetische Differenzierung über die Sequenzierung dieser Bereiche nicht möglich ist.

#### III.4.6. Phänotypische Charakteristika von *C. dubliniensis*

Die meisten verfügbaren Studien zur Epidemiologie und klinischen Bedeutung von *C. dubliniensis* verlassen sich bei der Identifizierung dieser Spezies auf phänotypische Tests. Zur Validierung dieser phänotypischen Differenzierungsmethoden wurden alle oropharyngealen Isolate dieser Studie auf drei häufig zitierte Phänotypen getestet, namentlich Koloniefärbung auf CHROMagar, Chlamydosporenmorphologie und Wachstumsverhalten bei 45°C. Zusätzlich die Beobachtung, dass *C. dubliniensis*, nicht jedoch *C. albicans*, Isolate auf Staib-Agar Chlamydosporen bilden auf ihre Validität als diagnostische Kriterium getestet.

Alle oropharyngealen Isolate wurden auf CHROMagar Candida ausgestrichen und nach 48h Inkubation bei 30°C als hellgrün oder dunkelgrün, jeweils im Vergleich zu den Referenzstämmen SC 5314 (*C. albicans*) und CBS 7987 (*C. dubliniensis*) beschrieben.

Eine dunkelgrüne Koloniefärbung wurde bei 29,1% der oropharyngealen Isolate beobachtet und in Anlehnung an Schoofs *et al.* als hinweisend auf *C. dubliniensis* gewertet. Im Gegensatz dazu zeigt 70,9% der Isolate eine typische, hellgrüne Färbung (Abb. 14). Erwartungsgemäß zeigte sich bei keinem Isolat eine nicht-grüne Koloniefärbung, was die gute Zuverlässigkeit der Speziesidentifizierung auf CHROMagar Candida für *C. albicans/dubliniensis* unterstreicht. 81,0% der *C. dubliniensis* Isolate konnten anhand ihrer Koloniefärbung korrekt identifiziert werden, während 19,0% eine auf *C. albicans* hinweisende hellgrüne Färbung aufwiesen (Abb. 14). Die dunkelgrüne Koloniefärbung war

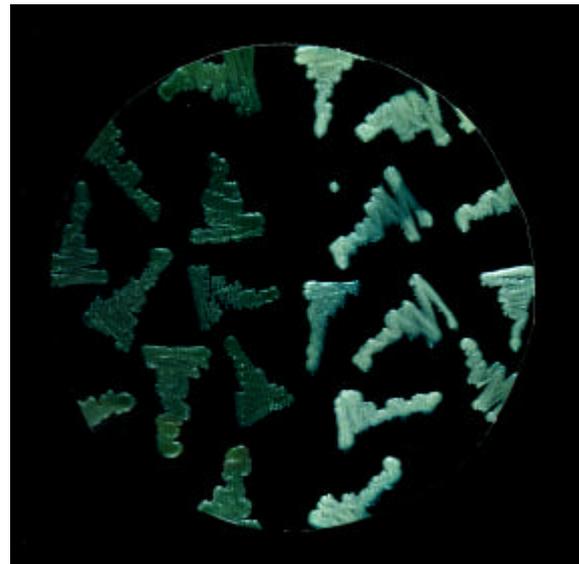


Abb. 14 Koloniefärbung auf CHROMagar

Auf diesem Farbindikatormedium ist *C. dubliniensis* oft dunkelgrün gefärbt (links), im Unterschied zu den hellgrünen *C. albicans* Kolonien (rechts).

jedoch nicht spezifisch für *C. dubliniensis*, sondern wurde auch in 15,9% der *C. albicans* Isolate beobachtet, die damit fälschlicherweise in diesem Test als *C. dubliniensis* klassifiziert

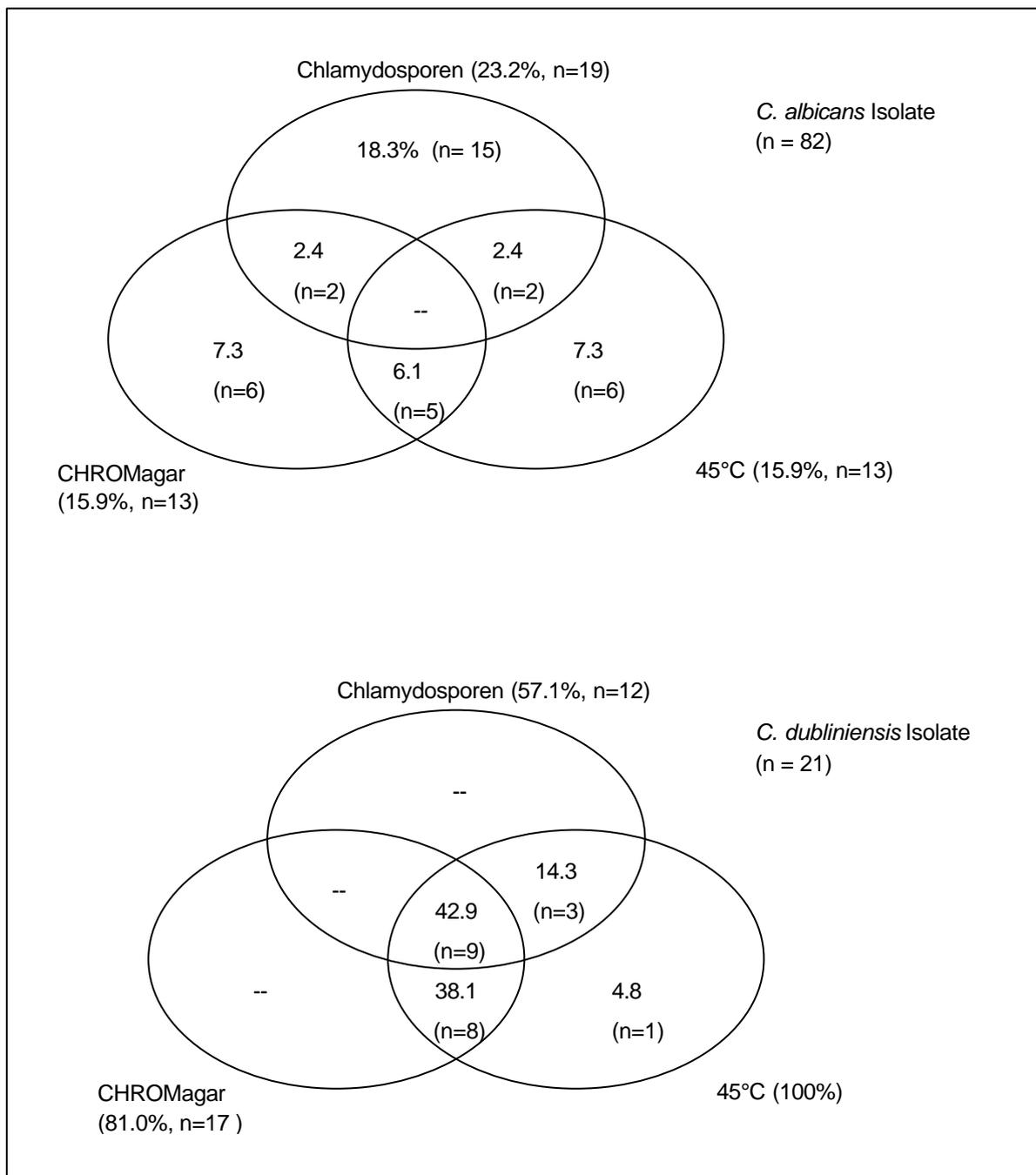


Abb. 15: Ergebnisse der phänotypischen Tests bei *C. albicans* (a) und *C. dubliniensis* (b)

45°C= Wachstumsdefizit bei 45°C; Chlamydosporen= Chlamydosporendupletts oder -tripletts auf RT-Agar; CHROMagar= dunkelgrüne Koloniefärbung auf CHROMagar Candida. Darstellung als Venn-Diagramme, überlappende Kreise zeigen die Präsenz von zwei (oder drei) der Charakteristika an. Summenwerte für einzelne Charakteristika in Klammer. n=absolute Anzahl der Isolate. 56,1% der *C. albicans*, aber keines der *C. dubliniensis* Isolate zeigten keines der aufgeführten Kriterien.

wurden (Abb. 15). Damit ergibt sich für die Koloniefärbung auf CHROMagar Candida im Hinblick auf die Identifizierung von *C. dubliniensis* eine Sensitivität von 81,0% bei einer Spezifität von 84,1% (Tab. 4). Aufgrund der deutlich niedrigeren Inzidenz von *C. dubliniensis* errechnet sich der positiv prädiktive Wert der Koloniefärbung mit lediglich 56,7% (Tab. 4).

Zusätzlich wurden alle oropharyngealen Isolate auf vorgewärmten YPD Platten ausgestrichen und bei 45°C inkubiert. Fehlendes Wachstum nach Inkubation von 72h fand sich bei 33,0% der Isolate und gilt als Hinweis auf *C. dubliniensis* (Pinjon *et al.*, 1998; Abb.16). Alle 21 *C. dubliniensis* Isolate zeigten dementsprechend ein Wachstumsdefizit bei 45°C. Allerdings war auch ein beträchtlicher Anteil der *C. albicans* Isolate in dieser Studie nicht in der Lage, bei dieser Temperatur zu wachsen (15,9%) (Abb. 15). Für das Wachstumsdefizit bei 45°C ergibt sich damit im Hinblick auf die Identifizierung von *C. dubliniensis* eine Sensitivität von 100% (Tab. 4). Damit ist dieser Test sehr gut als Screeningverfahren geeignet um in einer größeren Anzahl chlamydosporenpositiver Isolate putative *C. dubliniensis* Isolate einzugrenzen. Allerdings ist auch dieser Test nicht spezifisch für *C. dubliniensis* und besitzt einen positiv prädiktiven Wert von nur 61,8% (Tab. 4). Von den 13 *C. albicans* Isolaten in dieser Studie, die bei 45°C kein Wachstum zeigten, hatten 5 (38,4%) eine atypisch dunkelgrüne Koloniefärbung auf CHROMagar gezeigt, was für eine Abhängigkeit dieser beiden Merkmale spricht. Die Chlamydosporenmorphologie wurde mikroskopisch nach einer Wachstumsphase von 48h bei 30°C auf Reis-Tween Agar beurteilt. Insbesondere Duplett und Triplet Formationen sind als typisch für *C. dubliniensis* beschrieben worden und fanden sich in 30,0% der oropharyngealen Isolate in dieser Studie (Abb. 16). Allerdings wiesen nur 57,1% der *C. dubliniensis* Isolate typische Chlamydosporenformationen auf (Abb. 15). Außerdem fanden sich Dupletts und Triplets auch bei 23,2% der *C. albicans* Isolate (Abb. 15).

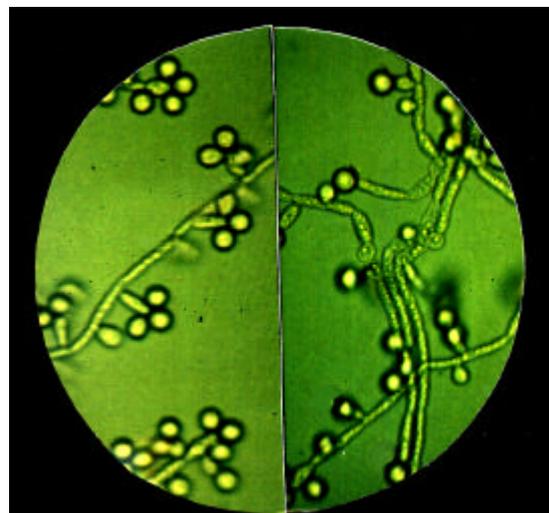


Abb. 16: Chlamydosporenmorphologie auf Reis-Tween Agar

Links die abundanten Chlamydosporen von *C. dubliniensis* mit Triplets und Dupletts, rechts die einzelnen Chlamydosporen von *C. albicans*.

Damit ist diese morphologische Eigenschaft von *C. dubliniensis* nicht zur Speziesidentifizierung geeignet (Tab. 4).

Tabelle 4: Testgüte der morphologischen Diskriminationsverfahren

	Spezifität	Sensitivität	Positiv prädiktiver Wert
<b>Chlamydosporen auf Staib Agar</b>	100%	100%	100%
<b>abundante Chlamydosporen</b>	76.8%	57.1%	38.7%
<b>Wachstumsdefizit bei 45°C</b>	84.1%	100%	61.8%
<b>Atypische Koloniefärbung auf CHROMagar</b>	84.1%	81.0%	56.7%

Spezifität = Prozentsatz der korrekt als *C. albicans* identifizierten Isolate; Sensitivität = Prozentsatz der korrekt als *C. dubliniensis* identifizierten Isolate; Positiv prädiktiver Wert = Wahrscheinlichkeit der Korrektheit einer Identifizierung von *C. dubliniensis* mit dem jeweiligen Test.

Die Kombination aller drei beschriebenen Phänotypen fand sich nur bei *C. dubliniensis* Isolaten und ist damit ein starker Hinweis auf die Zugehörigkeit zu dieser Spezies. Allerdings wiesen weniger als die Hälfte aller *C. dubliniensis* Isolate alle drei Merkmale auf (42,9%) (Abb. 15). 56.1% der *C. albicans* Isolate zeigten keines der drei phänotypischen Merkmale. Im Gegensatz dazu fand sich bei allen *C. dubliniensis* Isolaten zumindest eines davon.

Im Gegensatz zu den anderen Phänotyp-basierten Testverfahren zeigte sich die Untersuchung der Koloniemorphologie auf Staibagar in dieser Studie als gleichwertig zu den molekularen Verfahren (Tab. 4). Alle *C. dubliniensis* Isolate, aber kein *C. albicans* Isolat, bildeten auf Staibagar am Rand der Kolonien Hyphen und endständige Chlamydosporen aus (Abb. 17).

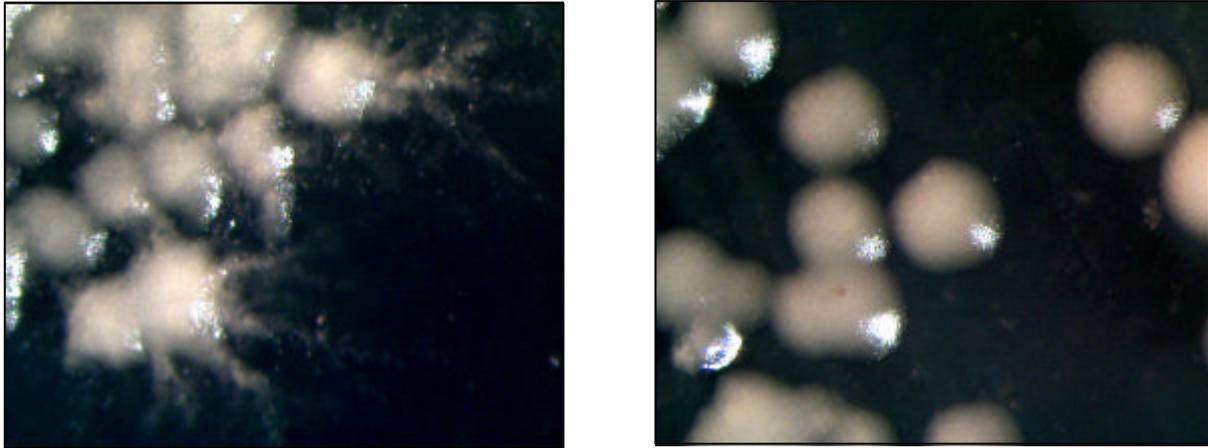


Abb. 17: Koloniemorphologie von *C. dubliniensis* und *C. albicans* auf Staib-Agar

Auf diesem Medium bildet *C. dubliniensis* unregelmäßig begrenzte Kolonien mit zahlreichen Ausläufern (links). Dies entspricht mikroskopisch einem filamentösen Wachstum am Rand der Kolonie mit Agarinvasivität und Ausbildung von Chlamydosporen. *C. albicans* Kolonien sind demgegenüber glatt begrenzt und zeigen mikroskopisch nur Hefezellen (rechts).

Dieser Phänotyp war nach einer Inkubationszeit von 48h bei 30°C eindeutig und ohne Schwierigkeit zu beurteilen. Zusätzlich zu den *C. dubliniensis* Isolaten aus dieser Studie wurden 10 weitere klinische Isolate dieser Spezies auf Staibagar getestet. Auch bei diesen 10 Isolaten zeigte sich die erwartete Koloniemorphologie sowie eine Chlamydosporenbildung.

#### III.4.7. Kohlenhydrat Assimilation von *C. dubliniensis*

Bereits in der Originalbeschreibung von *C. dubliniensis* wurde darauf hingewiesen, dass diese neue Spezies im Gegensatz zu *C. albicans* im Api AUX32 System Xylose,  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid und DL-lactat nicht assimilieren kann. Diese Unterschiede wurden in der Folge auch zur Identifizierung von *C. dubliniensis* Isolaten verwendet. In dieser Studie wurde zur Untersuchung der Assimilationsprofile von *C. dubliniensis* Isolaten ein neuartiges, kommerziell erhältliches Testsystem (Micronaut RC System) der Firma Merlin Diagnostica verwendet. In diesem System waren 50% der *C. dubliniensis* Isolate in der Lage, Xylose zu assimilieren. Im Gegensatz dazu sind in anderen Testsystemen nur 0-6% der getesteten *C. dubliniensis* Isolate zur Xyloseassimilation fähig (Tab. 5; Pincus *et al.*, 1999). Diese Eigenschaft ist auch bereits zur Identifizierung von *C. dubliniensis* verwendet worden. Während innerhalb von 24h im MICRONAUT RC System 100% unserer *C. dubliniensis* Isolate Trehalose verwerteten, schwankten die Ergebnisse mit anderen Systemen in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer

zwischen 0 und 99% (Tab. 5; Pincus *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass *C. dubliniensis* Isolate in der Lage waren, Xylose und Trehalose zu verwerten, wenn diese Eigenschaften nach der herkömmlichen Methode von Wickerham und Burton getestet wurden, spricht dafür, dass diese widersprüchlichen Ergebnisse mit der unterschiedlichen Sensitivität der einzelnen Testreaktionen erklärt werden können (Pincus *et al.*, 1999).

Die Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* erfolgt im MICRONAUT RC System über die Messung der  $\beta$ -Glukosidase Aktivität. Im Gegensatz zur weithin geläufigen Methode wird  $\beta$ -Glukosidase Aktivität in diesem System durch die Spaltung von p-Nitrophenyl- $\beta$ -glukosid bei pH 6,8 und 30°C gemessen. Alle getesteten *C. dubliniensis* Isolate waren  $\beta$ -Glukosidase negativ, während 119 getestete *C. albicans* Isolate unter diesen Bedingungen  $\beta$ -Glukosidase positiv waren (M. Mblitor, persönliche Kommunikation, Tab. 5). 92,9% der Primärisolate von den 14 Patienten mit *C. dubliniensis* wurden durch die computergestützte Auswertung korrekt identifiziert. Ein Isolat (HD-19) wurde fälschlicherweise als *Candida parapsilosis* klassifiziert aufgrund einer fehlenden N-Acetyl- $\beta$ -D-galactosaminidase Aktivität (Tab. 5). Alle sekundären Isolate (n=7) wurden korrekt als *C. dubliniensis* identifiziert.

Tabelle 5: Assimilationsprofile der *C. dubliniensis* Isolate (HD-1 – HD-20)

Stamm	NGA	$\alpha$ -GAL	PRO	PGUR	PHE	$\alpha$ -GLU	$\beta$ -GLU	URE	MEL	XYL	RHA	GEN	GLU	INO	CEL	SUC	TRE	GAL	MAL	LAC	RAF
HD-1	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-2*	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-3	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-4	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-5	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-6*	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-7	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
HD-8	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-9	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-10	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-11	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-12*	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-13*	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
HD-14	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-15	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-16*	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-17	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-18*	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
HD-19	-**	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-20	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HD-21	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
av. % cd	95	0	100	0	100	100	0	0	0	52	0	0	100	0	5	100	100	100	100	0	10
av cd	+	-	+	-	+	+	-	-	-	v	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
av. % ca	99	1	99	1	69	99	100	1	1	99	1	3	99	3	1	99	97	99	99	1	3
av ca	+	-	+	-	v	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-

NGA, N-Acetyl- $\beta$ -D-galaktosaminidase,  $\alpha$ -GAL,  $\alpha$ -Galaktosidase; PRO, L-Prolinaminopeptidase; PGUR,  $\beta$ -Glukuronidase; PHE, L-Phenylalaninaminopeptidase;  $\alpha$ -GLU,  $\alpha$ -Glukosidase;  $\beta$ -GLU,  $\beta$ -Glukosidase; URE, Urease; MEL, Melibiose-Assimilation, XYL, D-Xylose-Assimilation; RHA, L-Rhamnose-Assimilation; GEN, Gentiobiose-Assimilation; INO, Inositol-Assimilation; CEL, Cellobiose-Assimilation; SUC, Saccharose-Assimilation; TRE, Trehalose-Assimilation; GAL, Galaktose-Assimilation; MAL, Maltose-Assimilation; LAC, Laktose-Assimilation; RAF, Raffinose-Assimilation. av%, Prozentzahl von Isolaten, die in diesem Test positiv reagierten für *C. dubliniensis* (cd) und *C. albicans* (ca); av. cd, Durchschnittsprofil von *C. dubliniensis* Isolaten; av ca, Durchschnittsprofil von *C. albicans* Isolaten bei 119 getesteten *C. albicans* Stämmen; v, variables Profil. \*, diese Isolate sind Sekundärisolate \*\*, Isolate HD-19 wurde vom computerassistierten Auswertungssystem fälschlicherweise als *C. parapsilosis* klassifiziert wegen fehlender NGA Aktivität.

### III.4.8. Die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber Antimykotika

101 oropharyngeale Isolate aus dieser Studie, darunter alle *C. dubliniensis* Isolate, wurden in Mikrodilutionsassays nach der DIN Norm auf ihre Sensibilität gegenüber Fluconazol (Diflucan<sup>R</sup>), dem neueren Azol Itraconazol (Sempera<sup>R</sup>) und Amphotericin B getestet.

Dabei zeigten sich alle Isolate unabhängig von ihrer Spezieszugehörigkeit als sensibel gegenüber Amphotericin B mit minimalen Inhibierungskonzentrationen (MIC) von  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  (Tab 6.).

Tabelle 6: Verteilung der minimale Hemmkonzentrationen

Substanz	Isolatgruppe	MIC's										
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Fluconazol	<i>C. albicans</i> TX <sup>1</sup>	--	--	18 <sup>4</sup>	3	1	1	--	4	2	3	--
	<i>C. albicans</i> HIV <sup>2</sup>	--	--	23	11	4	--	1	1	--	1	7
	<i>C. dubliniensis</i> <sup>3</sup>	--	--	7	7	4	1	2	--	--	--	--
Itraconazol	<i>C. albicans</i> TX	9	3	4	5	3	4	2	2	--	--	--
	<i>C. albicans</i> HIV	11	12	11	1	1	3	1	4	3	1	--
	<i>C. dubliniensis</i>	6	9	3	1	1	--	--	--	1	--	--
Amphotericin B	<i>C. albicans</i> TX	--	3	20	9	--	--	--	--	--	--	--
	<i>C. albicans</i> HIV	1	4	41	2	--	--	--	--	--	--	--
	<i>C. dubliniensis</i>	10	8	3	--	--	--	--	--	--	--	--

<sup>1</sup> *C. albicans* Isolate von Transplantatpatienten (n=32; einer nicht getestet); <sup>2</sup> *C. albicans* Isolate von HIV-infizierten Patienten (n=48, einer nicht getestet); <sup>3</sup> *C. dubliniensis* Isolate (n=21); <sup>4</sup> absolute Anzahl von Isolaten aus dieser Gruppe, die mit der jeweiligen MIC getestet wurde.

Demgegenüber fand sich eine Anzahl von Isolaten mit erhöhten MICs gegenüber Fluconazol und Itraconazol. Eine MIC  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  für Fluconazol fand sich bei 18 *C. albicans* Isolaten (22,5% der *C. albicans* Isolate), aber in keinem der 21 *C. dubliniensis* Isolate (Tab. 6). 11 *C. albicans* Isolate (13,8%) zeigten eine MIC  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  für Itraconazol. Unter diesen waren

auch 8 der Isolate mit einer gesteigerten MIC gegen Fluconazol (Tab. 6). Dagegen war lediglich bei einem *C. dubliniensis* Isolat die MIC für Itraconazol  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  (4,8%) (Tab. 6). Für alle drei Antimykotika wurden die durchschnittlichen MIC innerhalb einer Spezies bestimmt. Dabei wurden die *C. albicans* Isolate je nach Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt, solche von Transplantatempfängern und solche von HIV Patienten. Für keines der drei Medikamente fand sich ein relevanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen von *C. albicans* Isolaten. Demgegenüber zeigte sich die durchschnittliche MIC für die *C. dubliniensis* Isolate bei allen drei Wirkstoffen um eine Stufe erniedrigt gegenüber den *C. albicans* Isolaten (Abb. 18). Diese Beobachtung war nicht durch Mehrfachisolierungen von einzelnen Patienten beeinflusst. Auch wenn nur die Primärisolate jedes Patienten in die Statistik aufgenommen wurden, ergaben sich identische Werte (nicht gezeigt). Weitergehende Untersuchungen mit anderen Verfahren werden zur Zeit durchgeführt. Dabei sollen auch Empfindlichkeiten gegenüber neueren Antimykotika getestet werden.

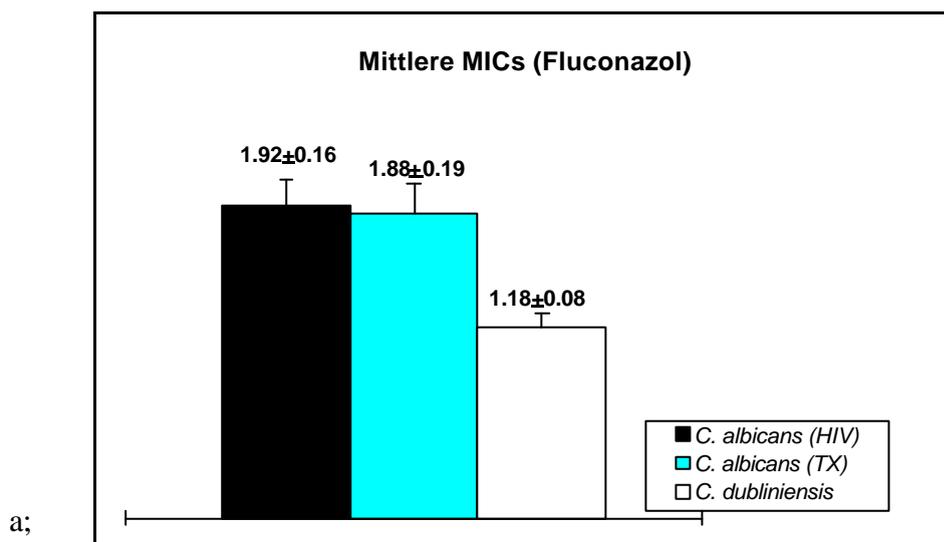
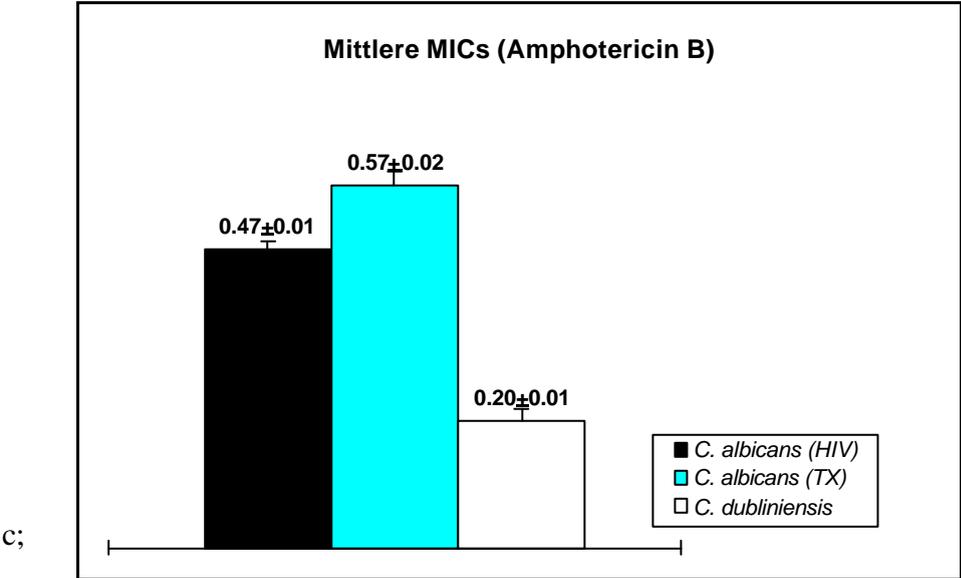
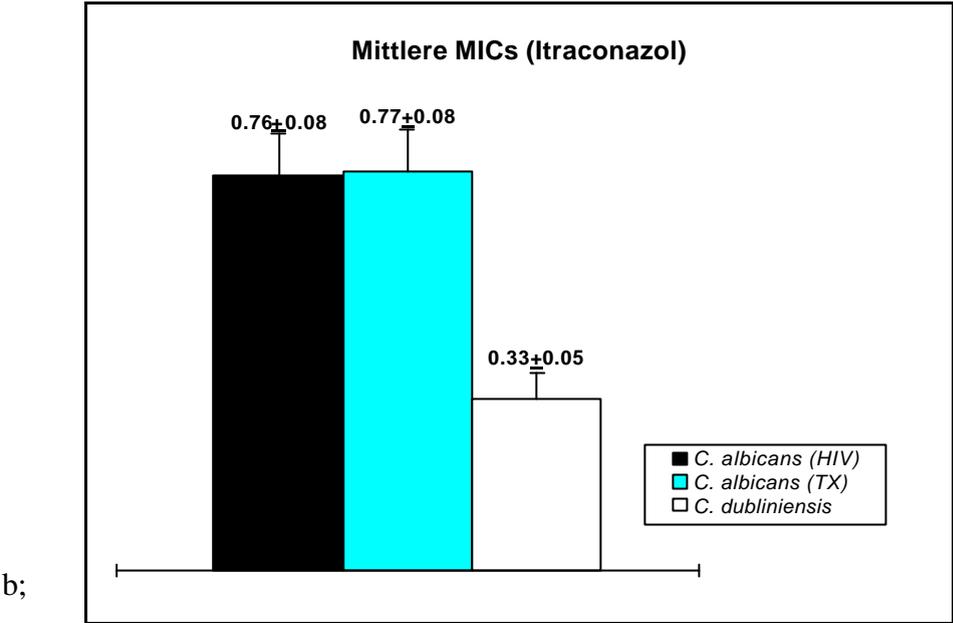


Abb. 18a-c: Mittlere Sensitivität der Isolate gegen Antimykotika

Zur Bestimmung der mittleren Sensitivität (als durchschnittliche MIC) wurden die oropharyngealen *C. albicans* Isolate nach dem Patientenkollektiv in solche von Transplantatpatienten und solche von HIV-Patienten unterteilt. Für alle getesteten Antimykotika (Fluconazol (a), Itraconazol (b) und Amphotericin B (c), letztere umseitig) zeigen sich die *C. dubliniensis* Isolate im Durchschnitt sensibler als beide Gruppen der *C. albicans* Isolate.



## **IV. DISKUSSION**

### **IV.1. Biologie von *Candida dubliniensis***

*C. dubliniensis* ist eine humanpathogene Hefespezies, die 1995 erstmals beschrieben wurde (Sullivan *et al.*, 1995). Sie zeichnet sich durch eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu *C. albicans* aus und wird mittels routinemäßig in der Diagnostik von Pilzinfektionen verwendeten Differenzierungsverfahren nicht von *C. albicans* unterschieden (Sullivan und Coleman, 1998). Die nahe Verwandtschaft zu *C. albicans* zeigt sich weiterhin in der Tatsache, dass *C. dubliniensis* als einzige bisher bekannte non-*albicans* Spezies im Genus *Candida* in der Lage ist, auf eine Vielzahl von äußeren Bedingungen und Signalen mit der Ausbildung filamentöser Wachstumsformen zu reagieren (Gilfillan *et al.*, 1998). Diese als Dimorphismus bezeichnete Eigenschaft gilt als zentraler Bestandteil in der Pathogenese von Infektionen durch *C. albicans* (Odds, 1974; Lo *et al.*, 1997). Der pH-Wert der Umgebung zählt zu den multiplen Reizen, die bei *C. albicans* pseudohyphales und hyphales Wachstum induzieren können. Buffo und Soll untersuchten bereits 1984 das Zusammenspiel von Temperatur und UmgebungspH und beschrieben die Transitionspunkte beider Größen, die den sogenannten pH-regulierten Dimorphismus bei *C. albicans* kennzeichnen (Buffo *et al.*, 1984). Der pH-regulierte Dimorphismus zeichnet sich nicht nur durch eine einfache Induzierbarkeit im Labor aus, sondern ist wegen seiner direkten Bedeutung im Verlaufe einer Pilz-Wirt Interaktion von zentralem Interesse im Verständnis der Virulenz von *C. albicans*. Dem Mechanismus der pH-induzierten Filamentierung liegt auf molekularer Ebene die pH-abhängig regulierte Transkription verschiedener Effektorgene zugrunde (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlshlegel und Fonzi, 1997; Sentandreu *et al.*, 1998). Unter den etlichen bei *C. albicans* beschriebenen pH-abhängig regulierten Genen zeichnen sich *PHR1* und *PHR2* durch ein gegenläufig vom pH-Wert der Umgebung reguliertes Expressionsmuster aus, in dem *PHR1* nur bei neutralem und alkalischem pH-Wert exprimiert wird, *PHR2* dagegen nur unter sauren Bedingungen (Mühlshlegel *et al.*, 1998). Beide Gene sind funktionell homolog und spielen eine zentrale Rolle beim Aufbau des Glucangerüsts der Zellwand von *C. albicans* (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlshlegel und Fonzi, 1997; Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000). PHR homologe Gene sind bei verschiedenen Pilzspezies beschrieben worden (Vai *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 1998; Nakazawa *et al.*, 2000; Weig *et al.*, 2000). Dabei zeigte sich, dass *PHR1* und *PHR2* die einzi-

gen Gene innerhalb dieser Familie sind, die das beschriebene pH-abhängige Expressionsmuster aufweisen.

#### **IV.1.1. *CdPHR1* und *CdPHR2* sind PHR-Homologe bei *C. dubliniensis*.**

Mit Hilfe eines kombinierten Ansatzes aus direkter Amplifizierung und inverser PCR gelang in dieser Arbeit die Identifizierung von zwei PHR homologen Genen im Genom von *C. dubliniensis* (Heinz *et al.*, 2000). *CdPHR1* weist eine Homologie von 90,5% zu *PHR1* im offenen Leseraster auf, die Homologie von *CdPHR2* zu *PHR2* beträgt 91,7%, damit zeigen die beiden Paare eine höhere Diversität als bisher beschriebene *C. dubliniensis* Gene und ihre *C. albicans* Homologen (Donnelly *et al.*, 1999; Heinz *et al.*, 2000; Moran *et al.*, 2000). Charakteristische Merkmale der *C. albicans* Gene, wie putative GPI Verankerungsstellen und hydrophobe Regionen, finden sich auch bei den *C. dubliniensis* Homologen.

Wie bei *C. albicans* ist auch bei *C. dubliniensis* die Expression der PHR Gene streng durch das pH-Milieu der Umgebung reguliert. *CdPHR1* wird wie *PHR1* nur unter neutralen und alkalischen Bedingungen exprimiert, während *CdPHR2* wie *PHR2* nur in saurer Umgebung detektiert werden konnte.

#### **IV.1.2. *CdPHR1* ist funktionell homolog zu *PHR1* und *GAS1***

Die hohe Homologie der offenen Leseraster von *CdPHR1* und *PHR1* legt nahe, dass auch die Funktion beider Gene äquivalent sein könnte. Klassischerweise wird eine molekulargenetische Funktionsanalyse durch Änderung des Expressionslevels eines Gens erreicht, insbesondere durch Deletion und maximale Expression. Bei *C. dubliniensis* war zum Zeitpunkt dieser Studie eine solche Analyse noch nicht möglich. Auxotrophe Mutanten mit einem definierten zugrundeliegenden Phänotyp sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht beschrieben und erst kürzlich ergaben sich Ansätze für eine genetische Manipulation von *C. dubliniensis* (Staib *et al.*, 2000b). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer Weg zur Charakterisierung der Funktion von *CdPHR1* beschritten. Mit Hilfe der Expression dieses Gens in einer *C. albicans*  $\Delta phr1$  Deletionsmutante konnte der aberrante Phänotyp dieses Stammes aufgehoben werden. Damit ist gezeigt, dass *CdPHR1* das Fehlen von *PHR1* in *C. albicans* phänotypisch komplementieren kann, ein deutlicher Hinweis auf eine funktionelle Äquivalenz.

Dem Phänotyp der *Dphr1* Mutante liegt eine Alteration im Aufbau der Zellwand zugrunde, der im Wesentlichen auf einen alterierten Glukanmetabolismus zurückzuführen ist. Unter neutralen und alkalischen pH-Bedingungen findet sich in Wildtyp Stämmen eine verstärkte Quervernetzung von Glukanpolymeren, die in einer deutlichen Erhöhung des Anteils der nicht alkalilöslichen Glukanfraktion resultiert (Popolo und Vai, 1998). Diese strukturelle Veränderung des Glukangerüsts unter neutralen und alkalischen Bedingungen, die auch mit einer deutlichen Erhöhung des Anteils an  $\beta$ -1,6-Glukan als biochemischem Pendant der erhöhten Quervernetzung einhergeht, lässt sich in der *Dphr1* Mutante nicht beobachten, obwohl der Gesamtgehalt an Glukan gegenüber dem Wildtyp nicht verändert ist (Popolo und Vai, 1998). Stattdessen weist die Mutante einen um das durchschnittlich sechsfache erhöhten Chitingehalt in ihrer Zellwand auf. Dies resultiert in einer erhöhten Sensitivität der Mutante gegenüber Calcofluor White unter alkalischen Bedingungen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist in der Lage, an Chitinfibrillen zu binden und so deren Einbau in die Zellwand zu verhindern (Popolo und Vai, 1998). Auf eine Inhibierung der Chitinsynthese durch Nikkomyzin Z reagieren *Dphr1* Zellen ebenfalls wesentlich sensibler als Wildtyp Isolate (Popolo und Vai, 1998). Morphologisches Korrelat dieser Veränderungen ist eine abgerundete, deutlich vergrößerte Zellmorphologie mit bereits makroskopisch erkennbaren Defekten in der Tochterzellknospung (Saporito Irwin *et al.*, 1995; Fonzi, 1999; Abb. 7 Seite 63).

Durch die Analyse der zeitlichen Abfolge von biochemischen Veränderungen der Zellwand von *Dphr1* Mutanten nach Überführung der Zellen in ein alkalisches Milieu konnte als primärer Effekt der Deletion die vermehrte Verknüpfung von  $\beta$ -1,6-Glukan an Chitin beobachtet werden (Fonzi, 1999). Dies wird durch eine Störung in der physiologischerweise erfolgenden Verknüpfung von  $\beta$ -1,6-Glukan mit  $\beta$ -1,3-Glukan erklärt, die durch das Fehlen von Phr1 zustande kommt. Damit ist eine Funktion von Phr1 und Phr2 in der Quervernetzung des Glukangerüsts der Zellwand von *C. albicans* plausibel (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000).

Die maßgebliche Bedeutung dieser enzymatischen Funktion für den Aufbau der Pilzzellwand wird durch die Tatsache unterstrichen, dass sich funktionell identische Enzyme in ganz unterschiedlichen Pilzspezies finden (Mouyna *et al.*, 2000). Speziell für *C. albicans* ist die Deletion von *PHR1* und *PHR2* nicht nur mit einem deutlich alterierten Phänotyp *in vitro*, sondern auch mit einer *in vivo* pH-konditional massiv reduzierten Virulenz der Mutanten verbunden (Ghannoum *et al.*, 1995; De Bernardis *et al.*, 1998). Damit ist die weitere Charakterisierung dieser Enzyme auch von therapeutischem Interesse. Substanzen aus der Familie der Echino-

candine, die an ganz anderer Stelle in den Glukanstoffwechsel eingreifen, sind als potente Antimykotika bereits in der klinischen Erprobung (Ghannoum und Rice, 1999).

#### **IV.1.3. Die transkriptionelle Regulation von *PHR1* und *CdPHR1* erfolgt äquivalent**

Aus der Expression von *CdPHR1* unter Kontrolle von 1kb putativer Promotorinformation ergab sich noch eine weitere interessante Beobachtung. Trotz der Integration von *CdPHR1* abseits vom *PHR1* Locus an der Position des *URA3* Gens, erfolgt die Expression des Transkripts nach wie vor streng pH-reguliert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass 1 kb 5' von *CdPHR1* liegende Information ausreichend ist, um unabhängig von der genomischen Position des Gens die pH-gesteuerte Transkription zu ermöglichen. Neuere Arbeiten über die Steuerung pH-regulierter Funktionen in *C. albicans* beschreiben eine Signaltransduktionskaskade um den zentralen Transkriptionsfaktor *RIM101* (Porta *et al.*, 1999; Ramon *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000; El Barkani *et al.*, 2000b). *RIM101*, vormals auch als *PRR2* bezeichnet, weist Homologien zum Transkriptionsfaktor PacC von *Aspergillus nidulans* auf, der ebenfalls essentiell für die Regulation pH-gesteuerter Vorgänge ist. Für PacC wurden spezifische DNA-Bindungsstellen beschrieben, deren Anwesenheit in den Promotorregionen von Effektorgenen notwendig für eine pH-abhängige Induktion ist (Tilburn *et al.*, 1995). Sequenzidentische Stellen finden sich in pH-regulierten Genen von *C. albicans* nicht, was eine von PacC differierende Konsensus Sequenz für Rim101 impliziert. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der Promoter von *CdPHR1* zwar in *C. albicans*, nicht jedoch in *A. nidulans* eine pH-gesteuerte Expression des Gens vermittelt.

#### **IV.1.4. Die pH Kaskade hat direkten Einfluss auf die Filamentierung von *C. albicans***

Von besonderem Interesse im Hinblick auf die Pathogenität von *Candida* ist die direkte Verknüpfung der Kaskade um Rim101 mit der Regulation der Morphogenese. Diese Verbindung konnte kürzlich erstmals auf molekularer Ebene nachvollzogen werden. Eine dominant aktive Form von Rim101 ist in der Lage, unabhängig vom pH der Umgebung eine Filamentierung zu induzieren (El Barkani *et al.*, 2000b). Damit sind die natürlichen Limitationen des pH-abhängigen Dimorphismus für diese Mutation außer Kraft gesetzt. Der Einfluss der aktivierten Rim101 Form, die physiologischerweise unter neutralen und alkalischen pH-Bedingungen

durch Abspaltung einer C-terminalen, inhibierenden Domäne entsteht, auf die Filamentierung erfolgt in Abhängigkeit vom zentralen Transkriptionsregulator Efg1 (El Barkani *et al.*, 2000). Auf diese Weise ist die Kaskade um Rim101 direkt mit der Efg1 Kaskade und der Filamentierung von *C. albicans* verknüpft, zentralen Faktoren für die Virulenz von *C. albicans*.

Rim101 erfüllt aber neben der Efg1 vermittelten Induktion filamentösen Wachstums auch andere, Efg1 unabhängige Funktionen. Dazu zählt die pH-abhängige Induktion und Repression von pH-reguliert transkribierten Genen wie *PHR1* und *PHR2*. Die vorgestellten Daten legen die Existenz eines Rim101 homologen Transkriptionsfaktors bei *C. dubliniensis* nahe, der identische Konsensussequenzen erkennt wie Rim101 von *C. albicans*. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass die transkriptionelle Regulation von *CdPHR1* in *C. albicans* aufrecht erhalten wird, wenn dieses artfremde Gen unter der Kontrolle seines nativen Promotors eingeführt wird. Damit sind diese Konsensussequenzen putativ sowohl im *PHR1* als auch im *CdPHR1* Promotor vorhanden.

Erste Experimente mit von *RIM101* abgeleiteten Primern bestätigen die Existenz eines homologen Gens in *C. dubliniensis* (nicht publizierte Daten). Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Untersuchung der Antwort auf Veränderungen des pH-Milieus bei *Candida*.

#### **IV.1.5. *CdPHR1* in *S. cerevisiae* und *C. glabrata*.**

Mit der Expression von *CdPHR1* in der *GAS1* Deletionsmutante von *S. cerevisiae* Wb2d konnte gezeigt werden, dass auch *GAS1* und *CdPHR1* funktionell homolog sind. Im Gegensatz zu der für *C. albicans* beschriebenen Situation zeigte sich jedoch die Expression von *CdPHR1* unter Kontrolle seines nativen Promotors in *S. cerevisiae* nicht länger abhängig vom pH-Milieu der Umgebung. Identische Ergebnisse ergaben sich für die Expression von *PHR2* in parallel ausgeführten Experimenten. Dies könnte einerseits erklärt werden durch das Fehlen wesentlicher Transkriptionsregulatoren in *S. cerevisiae*, andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass Konsensussequenzen für homologe Regulatoren abweichen und so die Information des Promotors nicht dechiffriert werden kann. Zur genaueren Untersuchung dieser Frage wurde zusätzlich zu *CdPHR1* und *PHR2* einerseits ein dominant aktives Allel von *RIM101*, andererseits ein normales Allel dieses Transkriptionsfaktors in *S. cerevisiae* eingeführt. In beiden Fällen wurde jedoch weder die Expression von *PHR2* noch die von *CdPHR1* beeinflusst.

Überraschenderweise wird *CdPHR1* unter Kontrolle seines nativen Promoters in *C. glabrata* überhaupt nicht exprimiert. In dieser eng mit *S. cerevisiae* verwandten Spezies mit zunehmender pathogener Bedeutung existieren zumindest drei beschriebene PHR homologe Gene (*CgGAS1-3*). Für keines dieser drei Gene findet sich eine pH-regulierte Expression. *CgGAS1* und *CgGAS2* werden konstitutiv exprimiert, für *CgGAS3* konnte unter einer Vielzahl von verschiedenen Bedingungen kein Transkript detektiert werden. *CgGAS1* und *CgGAS2* sind wie *CdPHR1* in der Lage, den Deletionsphänotyp der *S. cerevisiae*  $\Delta gas1$  Mutante zu komplementieren. Unter der Kontrolle ihres nativen Promoters kommt es für beide Gene zu einer starken Expression in *S. cerevisiae*. Diese Beobachtungen bestätigen die enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen *C. glabrata* und *S. cerevisiae* und legen gleichzeitig nahe, dass in beiden Spezies keine Kaskade existiert, die funktionell äquivalent zur pH-responsiven Kaskade von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist. Inwieweit Transkriptionsfaktoren mit Homologie zu *RIM101* in *C. glabrata* existieren und welche Funktion sie haben, ist noch unklar. In *S. cerevisiae* wurde ein *RIM101* homologes Gen beschrieben, das vielfältige Funktionen auch in der Regulation der Sporulation erfüllt (Su *et al.*, 1993b). Die unterschiedliche, wohl im Verlauf der Evolution gewandelte Funktion dieser Kaskade ist sicher von einigem Interesse im Hinblick auf die Pathogenität von *C. albicans* und *C. dubliniensis*.

#### **IV.2. Epidemiologie von *Candida dubliniensis***

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird unter Ausnützung von Sequenzunterschieden zwischen *PHR1* und *CdPHR1* ein PCR basiertes Verfahren zur Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* entwickelt. Dieses schnelle Verfahren wird im Rahmen einer epidemiologischen Studie evaluiert. Auf diese Weise molekularbiologisch exzellent klassifizierte Isolate werden daraufhin zur Evaluierung verschiedener morphologischer Tests, die zur Identifizierung von *C. dubliniensis* im Gebrauch sind, eingesetzt. Dabei kann unter anderem zum ersten Mal die Validität der erst kürzlich beschriebenen Eigenschaft von *C. dubliniensis*, auf Staibagar Chlamydosporen zu bilden, im Hinblick auf Speziespezifität gezeigt werden. Die oropharyngealen Isolate werden in weiteren Schritten biochemisch charakterisiert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber gebräuchlichen Antimykotika getestet.

#### IV.2.1. Entwicklung eines PCR Schnelltests

Die Speziespezifität des von *PHR1* abgeleiteten Primerpaares OK3 und OK4 zeigte sich bereits ohne Kenntnis der *CdPHR1* Sequenz anhand von Versuchen mit stetiger Erniedrigung der Annealingtemperatur. Nach Sequenzierung des gesamten offenen Leserasters zeigen sich die im reversen Primer OK4 positionierten Sequenzunterschiede, die verantwortlich für diese Speziespezifität sind. Wie bereits im Southernblot mit der *PHR1* und *PHR2* Sonde zeigt sich auch für das Primerpaar eine Kreuzreaktivität mit einzelnen non-*albicans* Spezies. Der Nachteil des PCR Assays ist jedoch die Tatsache, dass die Identifizierung von *C. dubliniensis* auf einem negativen Ergebnis beruht. Durch verschiedene Kontrollen lässt sich das Ergebnis jedoch hinreichend sichern. Zu diesem Zweck sind auch andere PCR Tests geeignet, die spezifisch für *C. dubliniensis* positiv reagieren (Donnelly *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2000).

Eine verbesserte diagnostische Sicherheit des PCR Tests ließe sich auch durch das Hinzufügen eines dritten Primers, der spezifisch für *CdPHR1* ist und etwa in der Mitte des offenen Leserasters bindet. Damit würde sich in der PCR eine 1,5kb große Bande bei *C. albicans* DNA und eine kleinere Bande bei *C. dubliniensis* DNA ergeben. Falsch negative Ergebnisse wären so ausgeschlossen.

Im Vergleich mit anderen molekularen Methoden ist die PCR sicherlich am schnellsten in der Lage, eine Aussage über die Spezieszugehörigkeit zu treffen. Es wurden jedoch multiple andere molekulare Verfahren zur Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* entwickelt (Elie *et al.*, 1998; Morschhäuser *et al.*, 1999). Diese sind allerdings vom technischen Aufwand ungleich schwieriger und speziellen Fragestellungen vorbehalten.

#### IV.2.2. Die phänotypische Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Die ursprüngliche Beschreibung von *C. dubliniensis* erfolgte anhand der genauen genotypischen und phänotypischen Untersuchung einer Gruppe als atypisch bezeichneter *C. albicans* Isolate (Sullivan *et al.*, 1995). Alle diese Isolate waren aufgrund ihrer Fähigkeit, Keimschläuche und Chlamydosporen auszubilden, routinemäßig als *C. albicans* klassifiziert worden. Neben *C. albicans* ist *C. dubliniensis* die einzige Spezies im Genus *Candida*, die diese beiden

charakteristischen Merkmale zeigt. Dies ist von besonderer Bedeutung für die mykologische Diagnostik, da vor allem die Chlamydosporenbildung auf Mangelmedien wie Reis-Tween Agar als spezifischer diagnostischer Test für *C. albicans* verwendet wird. In weitaus der meisten Zahl von Fällen werden *C. dubliniensis* Isolate daher als *C. albicans* fehlerklassifiziert. Die Chlamydosporenbildung ist im Gegensatz zu den *C. albicans* Referenzstämmen reichhaltiger, es lassen sich Doubletten und Tripletten von Chlamydosporen an einzelnen Stützzellen beobachten. In unserer Studie zeigt sich jedoch, wie auch bei anderen Autoren, dass diese Eigenschaft nicht zur Differenzierung zwischen beiden Spezies herangezogen werden kann (Tintelnot *et al.*, 2000).

Von *C. albicans* Referenzstämmen unterscheiden sich *C. dubliniensis* Isolate weiterhin durch ein reduziertes Wachstum bei 42°C und 45° (Pinjon *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft ist immer wieder als schneller und zuverlässiger Test postuliert und verwendet worden. In unserer Studie zeigt sich für dieses Verfahren eine hohe Sensitivität im Hinblick auf die Identifizierung von *C. dubliniensis*. Damit hat diese einfach durchzuführende Untersuchung sicher einen Stellenwert bei der Selektion von *C. dubliniensis* aus chlamydosporenspezifischen Isolat. Es sollte jedoch beachtet werden, dass auch ein gewisser Prozentsatz an *C. albicans* nicht bei 45°C wächst.

CHROMagar *Candida* ist ein diagnostisches Medium, auf dem verschiedene *Candida* Spezies aufgrund unterschiedlicher Koloniefärbungen voneinander differenziert werden können. Während sich *C. albicans* Isolate meist hellgrün färben, sind *C. dubliniensis* Isolate als eher dunkelgrün beschrieben worden (Schoofs *et al.*, 1997). Allerdings zeigte sich, dass dieses Kriterium nur bedingt zur zuverlässigen Unterscheidung geeignet ist und immer in anderen Testverfahren bestätigt werden sollte.

Erst kürzlich konnte von Staib und Morschhäuser in einer 25 Stämme umfassenden Studie gezeigt werden, dass *C. dubliniensis* im Gegensatz zu *C. albicans* auf Staib-Agar (*Guizotia abyssinica*-Kreatinin Agar), einem in der Diagnostik von *Cryptococcus neoformans* verwendeten Medium, Chlamydosporen bildet (Staib und Morschhäuser, 1999). In der vorliegenden Studie wurde dieser Test mit einer Spezifität und Sensitivität von 100% evaluiert und zeigte sich damit zuverlässiger als das Wachstumsdefizit bei 45°C und die Farbdagnostik mit CHROMagar. Obwohl abzuwarten bleibt, ob sich diese günstigen Ergebnisse auch bei der Untersuchung größerer Isolatzahlen unterschiedlicher geographischer Herkunft bestätigen, so legen unsere Zahlen doch eine Verwendung dieses Verfahrens zur Diskrimination zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* nahe. In einer großen Studie zur diagnostischen Validität von Chlamydosporenbildung auf Staib-Agar fanden sich für 127 von 130 (97.7%) *C. dubliniensis*

Isolaten raue Kolonien. Bei 85.5% diese Stämme ließen sich auch Chlamydosporen beobachten (Al Mosaid *et al.*, 2001). Demgegenüber fand sich bei keinem von 166 *C. albicans* Isolaten raue Koloniemorphologie oder Chlamydosporenbildung (Al Mosaid *et al.*, 2001). Während sich die Spezifität dieses morphologischen Tests in dieser Studie also bestätigt, ist die Sensitivität doch eingeschränkt. Allerdings verweisen die Autoren auf die exzellente Validität des Kriteriums „raue Koloniemorphologie“ (Al Mosaid *et al.*, 2001).

Viele andere Verfahren zur phänotypischen Unterscheidung zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* sind beschrieben worden (Bikandi *et al.*, 1998; Timmins *et al.*, 1998; Velegraki *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999b). Einige wurden auch in epidemiologischen Studien zur Identifizierung verwendet. Bei all diesen phänotypischen Merkmalen beruht jedoch die Heranziehung als Unterscheidungskriterium auf rein empirischen Maßstäben und erfordert eine sorgfältige Überprüfung.

#### **IV.2.3. Evaluierung bisheriger epidemiologischer Studien im Hinblick auf die Güte der Diskriminierungsverfahren**

Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit existieren nur wenige Studien zur Epidemiologie von *C. dubliniensis*. Die meisten davon verlassen sich bei der Identifizierung von *C. dubliniensis* auf eine Kombination phänotypischer Merkmale, oft sind die Koloniefärbung auf Chromagar und das Wachstumsverhalten bei 45°C first-line Tests (Schoofs *et al.*, 1997; Odds *et al.*, 1998; Kirckpatrick *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 1999; Jabra-Rizk *et al.*, 2000). Nach den hier vorgestellten Ergebnissen ist zu erwarten, dass in so konstruierten Studien nur ein Teil der *C. dubliniensis* Stämme korrekt identifiziert wird. Dies gilt insbesondere für Studien, in denen die phänotypischen Tests sukzessive hintereinander geschaltet werden (Jabra-Rizk *et al.*, 1999). Lediglich in zwei Studien erfolgt frühzeitig oder mit einem großen Anteil der Primärisolate eine molekulare Testung (Odds *et al.*, 1998; Kirckpatrick *et al.*, 1998).

#### **IV.2.4. Biochemische Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis***

Bereits in der Erstbeschreibung von *C. dubliniensis* wurde im Vergleich zu *C. albicans* auf das unterschiedliche Potential zur Assimilierung verschiedener Kohlenstoffquellen im API ID 32C hingewiesen (Sullivan *et al.*, 1995). Die für *C. dubliniensis* als typisch beschriebene

Konstellation von Reaktionen führt in diesem System zu einer „unzuverlässigen“ Identifizierung als *Candida sake* (Sullivan *et al.*, 1997). Besonders die nach dieser Beschreibung fehlende Fähigkeit zur Xylose und  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid Assimilation wurde in der Folgezeit auch diagnostisch genutzt und diente unter anderem der Identifizierung der ersten *C. dubliniensis* Isolate aus den USA (Salkin *et al.*, 1998). In dieser Arbeit verwenden die Autoren das API 20C System (bioMérieux Vitek Inc.) und gelangen damit zu ähnlichen Ergebnissen wie Sullivan 1995. Erste Probleme mit der biochemischen Klassifizierung beschreiben Schoofs *et al.* 1997. Ebenfalls im API ID 32C System finden sie im Gegensatz zu früheren Berichten eine Assimilation von Lactat und  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid. Außerdem beschreiben sie eine Variabilität der Assimilationsprofile einzelner Isolate bei wiederholter Testung (Schoofs *et al.*, 1997). Auch die Erstbeschreiber von *C. dubliniensis* betrachten die biochemische Identifizierung dieser Spezies 1998 schließlich kritisch (Sullivan und Coleman, 1998). Pincus *et al.* publizierten im November 1999 eine umfassende Untersuchung zum biochemischen Phänotyp von *C. dubliniensis*. 80 *C. dubliniensis* Isolate wurden in fünf unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Systemen getestet und auf vom *C. albicans* Muster abweichende Reaktionen hin untersucht. Im API 20C System und im API ID32C System bestätigten sich die bekannten Unterschiede, von denen insbesondere die fehlende Assimilation von Xylose,  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid und Trehalose zur Klassifizierung herangezogen werden. Etwa 70% aller *C. dubliniensis* Isolate werden in diesen beiden Systemen korrekt identifiziert, wobei eine Verlängerung der Inkubationszeit von 48h auf 72h im API 20C System allerdings zu einer Fehlidentifizierung von 95% aller *C. dubliniensis* Isolate als *C. albicans* führt, da nach dieser Zeit kein Unterschied mehr in der Trehalose Assimilation gemessen werden kann. Auch im Testsystem VITEK YBC zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Assimilationsprofile von der Inkubationszeit. Auch hier ist die fehlende Xylose Assimilation stärkstes Kriterium für *C. dubliniensis* (Gales *et al.*, 1999). Die besten Ergebnisse werden mit dem VITEK 2 ID-YST System erzielt, das 98% aller *C. dubliniensis* Isolate korrekt identifiziert (Pincus *et al.*, 1999, Graf *et al.*, 2000). Testet man *C. dubliniensis* Isolate in traditionellen Assays auf ihre Assimilationsfähigkeit, so zeigt sich, dass alle Isolate in der Lage sind, Xylose, Trehalose und  $\alpha$ -Methyl-D-glucosid zu assimilieren, wenn auch in teilweise sehr langsamen Reaktionskinetiken (Pincus *et al.*, 1999). Alle diskriminativen Ergebnisse der kommerziellen Systeme sind daher als ein Ausdruck der Sensitivität der entsprechenden Reaktion zu werten und nicht Hinweis auf ein reales Assimilationsdefizit von *C. dubliniensis*.

#### IV.2.5. Das Micronaut RC System

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Testsystem verwendet, in dem die Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* durch eine Messung der  $\beta$ -Glukosidase Aktivität erreicht wird. Schon vor der Erstbeschreibung von *C. dubliniensis* gab es Hinweise dafür, dass atypische *C. albicans* Isolate im Gegensatz zu Referenzstämmen keine intrazelluläre  $\beta$ -Glukosidase Aktivität aufweisen (Boerlin *et al.*, 1995). Die qualitative Messung dieser Aktivität mit  $\beta$ -Methylumbelliferyl wird dann als zuverlässiges Kriterium zur Identifizierung von *C. dubliniensis* bewertet (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan und Coleman, 1998; Schoofs *et al.*, 1997). Später werden allerdings vermehrt  $\beta$ -Glukosidase negative *C. albicans* Isolate beschrieben, bis hin zu einem Prozentsatz von 13% (Tintelnot *et al.*, 2000). Der im MICRONAUT RC System integrierte Test unterscheidet sich in wesentlichen biochemischen Eigenschaften vom klassischen Methylumbelliferyl-Assay. Vorläufige Analysen des Herstellers zeigen, dass nahezu alle getesteten *C. albicans* Isolate in diesem Assay positiv reagieren. Bis dato konnte lediglich ein  $\beta$ -Glukosidase negatives *C. albicans* Isolat gefunden werden. Auch in der vorliegenden Studie führte dieser Test zu einer optimalen Unterscheidung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*. 95% aller *C. dubliniensis* Isolate wurden korrekt identifiziert. Damit steht das getestete System sicherlich an der Spitze der gegenwärtig möglichen Trennschärfe biochemischer Assays. Trotz alledem erscheint die biochemische Untersuchung von *C. dubliniensis* eher zum Charakterisieren als zum Klassifizieren geeignet. Dies gilt insbesondere bis zu einer genauen Untersuchung beschriebener  $\beta$ -Glukosidase negativer *C. albicans* Stämme in der neuen  $\beta$ -Glukosidase Reaktion.

#### IV.2.6. Resistenzsituation bei *C. dubliniensis*

Immer wieder ist das Aufkommen von *C. dubliniensis* mit dem prophylaktischen Einsatz von Fluconazol assoziiert worden (Coleman *et al.*, 1997; Sullivan und Coleman, 1998). Diese Vermutung wurde vor allem durch die These gestützt, dass *C. dubliniensis in vitro* schneller als *C. albicans* in der Lage schien, unter Selektionsdruck eine Resistenz gegen Fluconazol zu entwickeln (Moran *et al.*, 1997). Dabei wurden keine Kreuzresistenzen zu anderen Azolen beobachtet. Gelegentlich sind auch primär gegen Fluconazol resistente *C. dubliniensis* Isolate

beschrieben worden, auch wenn die große Mehrzahl sensibel gegenüber diesem Antimykotikum war (Moran *et al.*, 1997; Sullivan und Coleman, 1998). Resistente *C. dubliniensis* Isolate wiesen meist nur leicht erhöhte MICs bis zu 32 µg/ml auf (Jabra-Rizk *et al.*, 1998; Kirckpatrick *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 2000). Die Fluconazol Resistenz bei *C. dubliniensis* beruht dabei auf ähnlichen Mechanismen wie bei *C. albicans*. So konnte beispielsweise ein Multidrug – Transporter (*CdMDR1*) identifiziert werden, der eine Homologie von 92% zu dem entsprechenden *C. albicans* Gen aufweist (Moran *et al.*, 1998).

Auch die Aktivität neuerer Antimykotika gegen *C. dubliniensis* ist untersucht worden. Dabei zeigten sich alle getesteten Isolate, auch solche mit Resistenzen gegen Fluconazol, weiterhin sensibel gegenüber den neuen Azolen, Echinocandinen oder auch Terbinafin (Ryder *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 1999).

#### IV.2.7. Sensibilität der Stämme in dieser Studie

101 der oropharyngealen Isolate aus dieser Studie wurden im Hinblick auf ihre Sensibilität gegenüber Amphotericin B, Fluconazol und Itraconazol getestet. Dabei waren alle Isolate empfindlich gegenüber Amphotericin B. Alle *C. dubliniensis* Isolate waren sensibel gegen Fluconazol und lediglich bei einem Isolat dieser Spezies zeigte sich eine erhöhte MIC gegen Fluconazol. Demgegenüber zeigten sich 22,5% der *C. albicans* Isolate resistent gegen Fluconazol (MIC > 8) und 13,8% resistent gegen Itraconazol (MIC > 8). Für die *C. albicans* Isolate getrennt nach HIV-Patienten und Transplantatempfängern zeigte sich kein Unterschied in der durchschnittlichen Sensibilität bei allen drei Wirkstoffen. Im Gegensatz dazu waren die *C. dubliniensis* Isolate jeweils deutlich empfindlicher gegenüber den Antimykotika. Es ergibt sich aus dieser Studie daher kein Anhalt für eine erhöhte Resistenzentwicklung bei *C. dubliniensis*.

Erst kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass Fluconazol neben seiner antimykotischen Wirkung auch sekundäre Effekte auf *C. dubliniensis* hat und so pathomechanistisch wichtige Vorgänge beeinflussen kann. So weisen einige *C. dubliniensis* Isolate in Gegenwart von Fluconazol eine erhöhte Adhärenz an epithelialen Zellen auf, die bei *C. albicans* nicht beobachtet wurde. Parallel mit dieser Adhärenzsteigerung lässt sich eine erhöhte Proteinase Sekretion bei *C. dubliniensis* beobachten (Borg von Zepelin *et al.*, 2000a; Borg von Zepelin *et al.*, 2000b). Es ist also weiterhin offen, ob die verstärkte Anwendung von Fluconazol einen Einfluss auf die Epidemiologie von *C. dubliniensis* hat.

### **IV.3. Bedeutung von *C. dubliniensis* aus klinischer und mykologischer Sicht**

Bis dato gibt es noch keinen Hinweis darauf, dass die Identifizierung von *C. dubliniensis* von klinischer Relevanz wäre. Eine regelmäßig oder gehäuft auftretende Resistenz gegenüber gebräuchlichen Antimykotika wird durch die vorliegenden Daten nahezu ausgeschlossen, so dass die Behandlung einer *C. dubliniensis* Infektion identisch ist mit der Therapie von *C. albicans* Infektionen. Über eventuelle Unterschiede in der Prognose werden erst größere Studien Auskunft geben können. Viele Fragen, die von klinischer Relevanz sind, bleiben dennoch weiterhin ungeklärt. Welche Folgen hat eine Kolonisierung der Mundhöhle durch *C. dubliniensis* bei HIV Patienten oder anderen immunkompromittierten Personen? Wie erklärt sich die enge Assoziation zwischen *C. dubliniensis* und HIV? Was bedingt das bevorzugte Auftreten von *C. dubliniensis* Infektionen im Oropharynx? Zur Klärung dieser Fragen ist es jedoch unabdingbar, dass *C. albicans* von *C. dubliniensis* unterschieden werden kann und wird. Dazu leisten die hier gesammelten Daten einen wesentlichen Beitrag.

Aus mykologischer Sicht ist es von besonderem Interesse, mehr über die Unterschiede zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans* zu lernen. Trotz einer hohen Verwandtschaft der beiden Genome finden sich große Unterschiede im Hinblick auf Epidemiologie und vermutlich auch auf Virulenz. Die Ursachen für diese Unterschiede sind bis jetzt völlig unklar. In naher Zukunft wird es jedoch möglich sein, mittels moderner biotechnischer Methoden neue Ansätze zur Lösung dieser Fragen zu finden. Microarrays der genomischen Information von *C. albicans* sind weltweit Objekt der Forschung und es wird nicht mehr lange dauern, bis das gesamte Genom dieses wichtigen Humanpathogens in dieser Form verfügbar ist. Durch die hohe phylogenetische Verwandtschaft zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* wird es im genomischen Maßstab möglich sein, beide Spezies miteinander zu vergleichen. Damit wird *C. dubliniensis* zum optimalen Modellorganismus in der Suche nach Virulenzfaktoren von *C. albicans*. Durch den Vergleich der genomischen Informationen beider Spezies können im Wissen um die unterschiedliche Pathogenität Rückschlüsse auf molekulare Ursachen gezogen werden. Die so gewonnenen Informationen könnten dann ein Gesamtbild ergeben, das neue Schlüsse über Art und Wesen der Pathogenität von *Candida* zulässt.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Candida dubliniensis* ist eine 1995 erstmals beschriebene pathogene Hefespezies mit enger phylogenetischer Verwandtschaft zu *Candida albicans*. Sie wird mittels routinemäßig angewendeter Verfahren nicht von *C. albicans* unterschieden, weil sie als einzige Spezies im Genus *Candida* neben *C. albicans* Chlamydosporen ausbilden kann. *C. dubliniensis* ist bisher vor allem aus dem Oropharynx HIV-positiver Patienten isoliert worden.

*PHR1* und *PHR2* sind funktionell homologe, pH-abhängig exprimierte Gene von *C. albicans*, deren Produkte essentiell für die Verknüpfung von  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukan in der Zellwand sind. Die Deletion jedes dieser Gene führt zu einem pH-abhängigen Phänotyp mit aberranter Morphogenese *in vitro* und reduzierter Virulenz im Tiermodell.

In dieser Arbeit werden PHR homologe Gene im Genom von *C. dubliniensis* charakterisiert. *CdPHR1* weist eine Homologie von 90,5% zu *PHR1* und *CdPHR2* eine Homologie von 91,7% zu *PHR2* auf. Wie *PHR1* wird auch *CdPHR1* nur unter neutralen und alkalischen Bedingungen exprimiert, während sich *CdPHR2* Transkript, wie das von *PHR2*, nur unter sauren Bedingungen nachweisen lässt.

Die funktionelle Homologie von *CdPHR1* zu *PHR1* wird durch Komplementation des Phänotyps einer *C. albicans* *Dphr1* Mutante mit *CdPHR1* gezeigt. Dabei erweist sich der native Promoter von *CdPHR1* als funktional in *C. albicans*. Im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* wird *CdPHR1* unter Kontrolle seines nativen Promotors dagegen pH-unabhängig exprimiert. Auch die zusätzliche Einführung eines mutierten, dominant aktiven Allels von *RIM101*, das in *C. albicans* für die pH-abhängige Genexpression verantwortlich ist, hat darauf keinen Einfluss. In *C. glabrata* und *Aspergillus nidulans* findet sich keine Expression von *CdPHR1*.

Basierend auf Sequenzunterschieden zwischen *PHR1* und *CdPHR1* wird ein PCR-Schnelltest zur Speziesunterscheidung entwickelt. Dieser wird in einer epidemiologischen Studie mit 133 chlamydosporenpositiven klinischen Isolaten evaluiert. 21 oropharyngeale Isolate von 14 HIV-positiven Patienten können so retrospektiv als *C. dubliniensis* klassifiziert werden, dies entspricht einer Prävalenz von *C. dubliniensis* in diesem Kollektiv von 30%. Die Ergebnisse der PCR werden durch Sequenzierung ribosomaler Gene (V3, ITS1, ITS2) bestätigt.

Parallel werden phänotypische Tests zur Identifizierung von *C. dubliniensis* auf ihre diagnostische Validität getestet. Während sich die Chlamydosporenmorphologie der Isolate und die Koloniefärbung auf dem Farbindikatormedium CHROMagar *Candida* als unzulänglich für die Unterscheidung erweisen und das für *C. dubliniensis* beschriebene Wachstumsdefizit bei

45°C zwar sensitiv, nicht aber spezifisch für die Identifizierung dieser Spezies ist, korreliert die Koloniemorphologie auf Staib-Agar zu 100% mit den molekularen Daten.

Alle *C. dubliniensis* Isolate werden in einem biochemischen Assay (Micronaut RC) untersucht, dabei zeigt der Test auf  $\beta$ -Glukosidase Aktivität hohes diskriminatorisches Potenzial. In Resistenztestungen zeigen sich die *C. dubliniensis* Isolate sensibler als die oropharyngealen *C. albicans* Isolate gegen gebräuchliche Antimykotika.

In dieser Studie kann gezeigt werden, dass *C. dubliniensis* und *C. albicans* auf teilweise austauschbare Mechanismen zur Reaktion auf Alterationen des pH-Milieus verfügen. Die pH-abhängige Regulation zellwandassoziierter Gene ist dabei eng mit morphogenetischen Prozessen verbunden. Trotz dieser Ähnlichkeit ist *C. dubliniensis* nicht nur weniger virulent als *C. albicans*, sondern zeigt auch ein unterschiedliches epidemiologisches Spektrum, das durch eine Spezialisierung auf oropharyngeale Kolonisation und Infektion bei HIV-positiven Patienten gekennzeichnet ist.

Um die Gründe für diese Unterschiede aufzeigen zu können, ist eine verlässliche Identifizierung von *C. dubliniensis* notwendig. Dazu stellen die präsentierten Daten einerseits einen schnellen und verlässlichen PCR Test, andererseits eine sorgfältige Evaluierung derzeit gebräuchlicher phänotypischer Verfahren vor. Phänotypisch und genotypisch exzellent charakterisierte Isolate beider Spezies stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

## Literaturverzeichnis

1. **Al Mosaid, A., D. Sullivan, I. F. Salkin, D. Shanley, and D. C. Coleman.** 2001. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J. Clin. Microbiol.* **39**:323-327.
2. **Arst Jr., H. N., E. Bignell, and J. Tilburn.** 1994. Two new genes involved in signaling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**:787-790.
3. **Auger, P., and J. Joly.** 1977. Factors influencing germ tube production in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **61**:183-186.
4. **Ballance, D. J. and G. Turner.** 1985. Development of a high-frequency transformation vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**:321-331.
5. **Behari, J., and P. Youngman.** 1998. Regulation of *hly* expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by *PrfA*. *Infect. Immun.* **66**:3635-3642.
6. **Bikandi, J., R. S. Millan, M. D. Morafues, G. Cebas, M. Clarke, D. C. Coleman, D. J. Sullivan, G. Quindos, and J. Ponton.** 1998. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastopores and *Candida albicans* germ-tubes. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2428-2433.
7. **Blackwell, M.** 1993. Phylogenetic systematics and ascomycetes. p93-103. *In* D. R. Reynolds and J. W. Taylor (eds.), *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*, CAB International, Wallingford, UK.
8. **Blaschke-Hellmessen, R.** 1998. Vertikale Transmission von *Candida* and ihre Konsequenzen. *Mycoses* **41** Suppl. 2:31-36.
9. **Boerlin, P., F. Boerlin-Petzold, C. Durussel, M. Addo, J. L. Pagani, J. P. Chave, and J. Bille.** 1995. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1129-1135.
10. **Borg von Zeppelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard, and M. Monod.** 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol.* **28**:543-554.
11. **Borg von Zeppelin, M., T. Niederhaus, and K. Tintelnot.** 2000a. Adherence of clinical *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. 14<sup>th</sup> ISHAM Congress, 8-12 May, Buenos Aires, Argentina.
12. **Borg von Zeppelin, M., T. Niederhaus, und K. Tintelnot.** 2000b. Adhärenz verschiedener *Candida dubliniensis* Stämme in Gegenwart von Fluconazol. *Mycoses.* **43**:216-217(abstract).

13. **Brandt, M. E., L. H. Harrison, M. Pass, A. N. Sofair, S. Huie, R. K. Li, C. J. Morrison, D. W. Warnock, and R. A. Hajjeh.** 2000. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:46-49.
14. **Braun, B. R., and A. D. Johnson.** 1997. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**:105-109.
15. **Brown Jr., D. H. A. D. Giusani, X. Chen, and C. A. Kumamoto.** 1999. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol. Microbiol.* **34**:651-662.
16. **Brown, A. J. P., and N. A. R. Gow.** 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**:333-338.
17. **Brown, D. M., M. A. Jabra-Rizk, W. A. Falkler Jr., A. A. Baqui, and T. F. Meiller.** 2000. Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV-seropositive pediatric dental patients. *Pediatr. Dent.* **22**:234-238.
18. **Bruns, T.D., T. J. White, and J. W. Taylor.** 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**:525-564.
19. **Buffo, J., A. Herman, and D. R. Soll.** 1984. A characterization of pH-dependent dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**:21-30.
20. **Caddick, M. X., A. G. Brownlee, and H. N. Arst Jr.** 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203**:346-353.
21. **Carroll, J. A., C. F. Garon, and T. G. Schwan.** 1999. Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **67**:3181-3187.
22. **Chaffin, W. L., J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martínez.** 1998. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* **62**:130-180.
23. **Chen, Y. C., J. D. Eisner, M. M. Kattar, S. L. Rassoulian-Barrett, K. La Fe, S. L. Yarfitz, A. P. Limaye, and B. T. Cookson.** 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2302-2310.
24. **Cheng, J. T., R. T. Witty, R. R. Robinson, and W. E. Yarger.** 1982. Amphotericin B nephrotoxicity: increased renal resistance and tubule permeability. *Kidney Int.* **22**:626-633.
25. **Christianson, T. W., R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter.** 1992. Multifunctional yeast high copy number shuttle vectors. *Gene* **110**:119-122.
26. **Clayton, R. A., O. White, K. A. Ketchum, and J. C. Venter.** 1997. The first genome from the third domain of life. *Nature* **387**:459-462.

27. **Coleman D.C., D.J. Sullivan, D.E. Bennet, G.P. Moran, H.J. Barry, and D.B. Shanley.** 1997. Candidiasis: The emergence of a new species, *Candida dubliniensis*. *AIDS* **11(5)**: 557-567.
28. **Coleman, D. C., M. G. Rinaldi, K. A. Haynes, J. H. Rex, R. C. Summerbell, E. J. Anaissie, A. Li, and D. J. Sullivan.** 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med. Mycology* **36(S1)**:156-165.
29. **Cormack, B. P., N. Ghori, and S. Falkow.** 1999. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**:578-582.
30. **Csank, C. K., K. Schröppel, E. Leberer, D. Harcus, O. Mohamed, S. Meloche, D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* **66**:2713-2721.
31. **Cutler, J. E.** 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:187-218.
32. **Davis, D., J. E. Edwards, A. P. Mitchell, and A. S. Ibrahim.** 2000b. *Candida albicans* *RIM101* pH Response Pathway is required for Host-Pathogen Interactions. *Infect. Immun.* **68**:5953-5959.
33. **Davis, D., R. B. Wilson, A. P. Mitchell.** 2000a. *RIM101*-Dependent and -Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **20**:971-978.
34. **De Bernardis, F., F.A. Mühlischlegel, A. Cassone, and W.A. Fonzi.** 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **66**:3317-3325.
35. **De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schäfer, and A. Cassone.** 1999. Evidence that members of secretory aspartyl proteinases gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J. Infect. Dis.* **179**:201-208.
36. **Denison, S. H., M. Orejas, and H. N. Arst Jr.** 1995. Signaling of Ambient pH in *Aspergillus* Involves a Cysteine Protease. *J. Biol. Chem.* **270**:28519-28522.
37. **Denison, S. H., S. Negrete-Urtasun, J. M. Mingot, J. Tilburn, W. A. Mayer, A. Goel, E. A. Espeso, M. A. Peñalva, and H. N. Arst Jr.** 1998. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* **30**:259-264.
38. **Donnelly, S. M., D. J. Sullivan, D. B. Shanley, and D. C. Coleman.** 1999. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of *ACT1* intron and exon sequences. *Microbiology* **145**:1871-1882.

39. **El Barkani, A., K. Haynes, H.U. Mösch, M. Frosch, and F. A. Mühlshlegel.** 2000a. *Candida glabrata* shuttle vectors suitable for translational fusions to lacZ and use of  $\beta$ -galactosidase as a reporter of gene expression. *Gene* **246**:151-155.
40. **El Barkani, A., O. Kurzai, W. A. Fonzi, A. Ramon, A. Porta, M. Frosch, and F. A. Mühlshlegel.** 2000b. Dominant active alleles of *RIM101/PRR2* bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **20**:4635-4647.
41. **Elie, C. M., T. J. Lott, E. Reiss, and C. J. Morrison.** 1998. Rapid Identification of *Candida* Species with Species-Specific DNA Probes. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3260-3265.
42. **Engelmann, E.** 1999. Spezielle Mykologie, p.701-710. In H. Hahn, D. Falke, S. H. E. Kaufmann, and U. Ullmann (eds.) *Medizinische Mikrobiologie and Infektiologie* (3. Auflage). Springer, Berlin, Deutschland.
43. **Ernst, J. F.** 2000. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**:1763-1774.
44. **Espeso, E. A., J. Tilburn, H. N. Arst Jr., and M. A. Peñalva.** 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**:3947-3956.
45. **Espeso, E. A., J. Tilburn, L. Sánchez-Pulido, C. V. Brown, A. Valencia, H. N. Arst Jr., and M. A. Peñalva.** 1997. Specific DNA Recognition by the *Aspergillus nidulans* Three Zinc Finger Transcription Factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**:466-480.
46. **Espeso, E. A., and M. A. Peñalva.** 1996. Three Binding Sites for the *Aspergillus nidulans* pacC Zinc-finger Transcription Factor are necessary and sufficient for Regulation by Ambient pH of the Isopenicillin N Synthase Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* **271**:28825-28830.
47. **Fell, J. W.** 1993. Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* **3**:174-180.
48. **Fidel, P. L., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel.** 1999. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:80-96.
49. **Fonzi, W. A.** 1999. *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,6-glucans. *J. Bacteriol.* **181**:7070-7079.
50. **Fridkin, S. K., and W. R. Jarvis.** 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:499-511.
51. **Gale, C., D. Finkel, N. J. Tao, M. Meinke, M. McClellan, J. Olson, K. Kendrick, and M. Hostetter.** 1996. Cloning and expression of a gene encoding an integrin like protein in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:357-361.

52. **Gale, C.A., C. M. Brendel, M. McClellan, M. Hauser, J. M. Becker, J. Berman, and M. K. Hostetter.** 1998. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* **279**: 1355-1358.
53. **Gales, A. C., M. A. Pfaller, A. K. Houston, S. Joly, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, D. and R. Soll.** 1999. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3804-3808.
54. **Gallagher, P. J., D. E. Bennet, M. C. Henman, R. J. Russell, S. R. Flint, D. B. Shanley, and D. C. Coleman.** 1992. Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1901-1911.
55. **Gallis, H. A., R. H. Drew, and W. W. Pickard.** 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* **12**:308-329.
56. **Georgopapadakou, N. H., and J. S. Tkacz.** 1995. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.* **3**: 98-104.
57. **Ghannoum, M. A.** 2000. Potential Role of Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:122-143.
58. **Ghannoum, M. A., B. Spellberg, S. M. Saporito-Irwin, and W. A. Fonzi.** 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* *PHR1* mutants. *Inf. Immun.* **63**:4528-4530.
59. **Ghannoum, M. A., and L. B. Rice.** 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:501-517.
60. **Gilfillan G.D., D.J.Sullivan, K.A. Haynes, T. Parkinson, D.C. Coleman, and N.A.R. Gow.** 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144**, 829-838.
61. **Gillum A. M., E. Y. H. Tsay, and D. R. Kirsch.** 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.***198**:179-182.
62. **Graf, B., T. Adam, E. Zill, and U. B. Göbel.** 2000. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast like organisms. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1782-1785.
63. **Guarro, J., J. Gené, and A. M. Stchigel.** 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.
64. **Hannula, J., M. Saarela, B. Dogan, J. Paatsama, P. Koukila-Kähkölä, S. Pirinen, H.-L. Alakomi, J. Perheentupa, and S. Asikainen.** 2000. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**:238-244.

65. **Hazen, K. C.** 1995. New and Emerging Yeast Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:462-478.
66. **Heinz, W. J., O. Kurzai, A. A. Brakhage, W. A. Fonzi, H.-C. Korting, M. Frosch, and F. A. Mühlshlegel.** 2000. Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:231-238.
67. **Hoyer, L. L., T. L. Payne, M. Bell, A. M. Myers, and S. Scherer.** 1998. *Candida albicans ALS3* and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr. Genet.* **33**:451-459.
68. **Hube, B.** 1996. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr. Top. Med. Mycol.* **7**:55-69.
69. **Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, and W. Schäfer.** 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* **174**:362-374.
70. **Hube, B., M. Monod, D. A. Schofield, A. J. P. Brown, and N. A. R. Gow.** 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **14**:87-99.
71. **Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson.** 2000. Evidence for Mating of the asexual yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**:307-310.
72. **Hull, C. M., and A. D. Johnson.** 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science.* **285**:1271-1273.
73. **Jabra-Rizk, M. A., A. A. Baqui, J. I. Kelley, W. A. Falkler Jr., W. G. Merz, and T. F. Meiller.** 1999a. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **37**:321-326.
74. **Jabra-Rizk, M. A., W. A. Falkler Jr., W. G. Merz, A. A. M. A. Baqui, J. I. Kelley, and T. F. Meiller.** 2000. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected Individuals. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2423-2426.
75. **Jabra-Rizk, M. A., W. A. Falkler Jr., W. G. Merz, J. I. Kelley, A. A. Baqui, and T. F. Meiller.** 1999b. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1464-1468.
76. **Jarvis, W. R.** (1995) Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections, with Emphasis on *Candida* Species. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1526-1530.
77. **Joly, S., C. Pujol, M. Rysz, K. Vargas, and D. R. Soll.** 1999. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1035-1044.

78. **Kamei, K., M. J. McCullough, and D. A. Stevens.** Initial case of *Candida dubliniensis* infection from Asia: non-mucosal infection. *Med. Mycol.* **38**:81-83.
79. **Kappstein, I., I. Braveny, J. Cremer, and G. Bodey.** 1998. Opportunistische Pilzinfektionen. *Infektiologie - Klinikhygiene Weiterbildungsprogramm.* Klinikum rechts der Isar, Medco Verlagsgesellschaft, München.
80. **Kirkpatrick, W. R., S. G. Revankar, R. K. McAtee, J. L. Lopez-Ribot, A. W. Fothergill, D. I. McCarthy, S. E. Sanche, R. A. Cantu, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson.** 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in North America by Primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3007-3012.
81. **Kitada, K., E. Yamaguchi, and M. Arisawa.** 1995. Cloning of the *Candida glabrata* *TRP1* and *HIS3* genes and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* **165**:203-206.
82. **Kollar, R., E. Petrakova, G. Ashwell, P. W. Robbins, and E. Cabib.** 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and  $\beta$ -(1,3)-glucan. *J. Biol. Chem.* **270**:1170-1178.
83. **Kozel, T. R.** 1995. Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* **3**: 295-299.
84. **Kurtzman, C. P., and J. W. Fell (eds).** 1998. The yeasts, a taxonomic study. 4<sup>th</sup> ed, Elsevier Science B. V., Amsterdam, Niederlande.
85. **Li, W., and A. P. Mitchell.** 1997. Proteolytic Activation of Rim1p, a Positive Regulator of Yeast Sporulation and Invasive Growth. *Genetics* **145**:63-73.
86. **Lipke, P. N., and R. Ovalle.** 1998. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**:3735-3740.
87. **Liu, H., J. Kohler, and G. R. Fink.** 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**:1723-1726.
88. **Lo, H.-J., J. R. Köhler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**:939-949.
89. **Loeb, J. D. L., M. Sepulveda-Becerra, I. Hazan, and H. Liu.** 1999. A G1 cyclin is necessary for maintenance of filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:4019-4027.
90. **Lorthloray, O., and B. Dupont.** 1997. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:477-504.
91. **MacCabe, A. P., M. Orejas, J. A. Pérez-González, and D. Ramón.** 1998. Opposite Patterns of Expression of Two *Aspergillus nidulans* Xylanase Genes with Respect to Ambient pH. *J. Bacteriol.* **180**:1331-1333.

92. **Maccheroni Jr., W., G. S. May, N. M. Martinez-Rossi, and A. Rossi.** 1997. The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**:163-167.
93. **Magee, B. B., and P. T. Magee.** 2000. Induction of Mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science*. **289**:310-313.
94. **Manarelli, B. M., and C. P. Kurtzman.** 1998. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1634-1641.
95. **Margulis, L., and K. Schwartz.** 2000. Five Kingdoms – An illustrated guide to the phyla of life on earth. W. H. Freeman & Co., New York, USA.
96. **Martin, C., D. Roberts, M. van der Wiede, R. Rossau, G. Jannes, T. Smith, and M. Maher.** 2000. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3735-3752.
97. **Martins, M. D., and J. H. Rex.** 1996. Resistance to antifungal agents in the critical care setting: problems and perspectives. *New Horizons* **4**:338-344.
98. **McCullough, M. J., K. V. Clemons, and D. A. Stevens.** 1999. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:417-421.
99. **Meiller, T. F., M. A. Jabra-Rizk, A. A. Baqui, J. I. Kelley, V. I. Meeks, W. G. Merz, and W. A. Falkler.** 1999. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **88**:573-580.
100. **Meis, J. F., M. Ruhnke, B. E. De Pauw, F. C. Odds, W. Siegert, and P. E. Verweij.** 1999. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:150-153.
101. **Mims, C., J. Playfair, I. Roitt, D. Wakelin, and R. Williams.** 1998. *Medical Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Mosby Int. Ltd., London, Großbritannien.
102. **Mingot, J. M., J. Tilburn, E. Diez, E. Bignell, M. Orejas, D. A. Widdick, S. Sarkar, C. V. Brown, M. X. Caddick, A. E. Espeso, H. N. Arst Jr., and M. A. Peñalva.** 1999. Specificity determinants of Proteolytic processing of *Aspergillus* PacC Transcription Factor are Remote from the Processing Site and Processing Occurs in Yeast if pH Signaling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1390-1400
103. **Monod, M., B. Hube, D. Hess, and D. Sanglard.** 1998. differential regulation of *SAP8* and *SAP9* which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiol.* **144**: 2731-2744.
104. **Monod, M., G. Tagni, B. Hube, and D. Sanglard.** 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* **13**: 357-368.

105. **Moran G.P., D.J. Sullivan, M.C. Henman, C.E. McCreary, B.J. Harrington, B.S. Diarmuid, and D.C. Coleman.** 1997. Antifungal Drug Susceptibilities of Oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Subjects and Generation of stable Fluconazole-resistant Derivatives *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 617-623.
106. **Moran, G. P., D. Sanglard, S. M. Donnelly, D. B. Shanley, D. J. Sullivan, and D. C. Coleman.** 1998. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(7)**:1819-1830.
107. **Morschhäuser, J., M. Ruhnke, S. Michel, and J. Hacker.** 1999. Identification of CARE-2 negative *Candida albicans* isolates as *Candida dubliniensis*. *Mycoses* **42**:29-32.
108. **Mouyna, I., M. Monod, T. Fontaine, B. Henrissat, B. Lechenne, and J. P. Latgé.** 2000. Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1,3)glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochem. J.* **347**: 741-747.
109. **Mühlschlegel, F. A., W. A. Fonzi, L. Hoyer, T. Payne, F. M. Poulet, J. Clevenger, J-P. Latgé, J. Calera, A. Beauvais, S. Paris, M. Monod, J. Sturtevant, M. Ghanoum, Y. Nozawa, and R. Calderone.** 1998. Molecular Mechanisms of virulence in fungus-host interactions for *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **36(S1)**: 238-248.
110. **Mühlschlegel, F., and W.A. Fonzi.** 1997. *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent Expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5960-5967.
111. **Mutschler, E., and M. Schäfer-Korting.** 1996. *Arzneimittelwirkungen*. 7. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
112. **Nakazawa, T., H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi.** 1998. Isolation and Characterization of *EPD1*, an Essential Gene for Pseudohyphal Growth of a Dimorphic Yeast, *Candida maltosa*. *J. Bacteriol.* **180**:2079-2086.
113. **Nakazawa, T., M. Takahashi, H. Horiuchi, A. Ohta, and M. Takagi.** 2000. Cloning and characterization of *EPD2* a gene required for efficient pseudohyphal formation of a dimorphic yeast *Candida maltosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:369-377.
114. **Negrete-Urtasun, S., S. H. Denison, and H. N. Arst Jr.** 1997. Characterization of the pH Signal Transduction Pathway Gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and Identification of Possible Homologs. *J. Bacteriol.* **179**:1832-1835.
115. **Negrete-Urtasun, S., W. Reiter, E. Diez, S. H. Denison, J. Tilburn, E. A. Espeso, M. A. Peñalva, and H. N. Arst Jr.** 1999. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* **33**:994-1003.

116. **Nguyen, M. H., J. E. Peacock, A. J. Morris, D. C. Tanner, M. L. Nguyen, D. R. Snyderman, M. M. Wagner, M. G. Rinaldi, and V. L. Yu.** 1996. The changing face of candidemia – emergence of non *Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.* **100**:617-623.
117. **Odds, F. C.** 1974. The effect of growth medium on filament production in *Candida albicans*. *Sabouraudia* **12**:112-119.
118. **Odds, F. C.** 1988. *Candida and Candidosis*. Bailliere Tindall, London, UK.
119. **Odds, F. C., and R. Bernaerts.** 1994. CHROMagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important Candida Species. *J. Clin. Microbiol.* **32**:19-23-1929.
120. **Odds, F. C., G. van Nuffel, and G. Dams.** 1998. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2869-2873.
121. **Odds, F. C., and R. Bernaerts.** 1994. Chromagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1923-1929.
122. **Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst Jr., and M. A. Peñalva.** 1995. Activation of the Aspergillus PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes. Dev.* **9**:1622-1632.
123. **Park, S., M. Wong, S. A. Marras, E. W. Cross, T. E. Kiehn, V. Chaturvedi, S. Tyagi, and D. S. Perlin.** 2000. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2829-2836.
124. **Peltroche-Llacsahuanga, H., S. Schmidt, M. Seibold, R. Luticken, and G. Haase.** 2000. Differentiation between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by fatty acid methyl ester analysis using gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3696-3704.
125. **Peterson, S. W., and C. P. Kurtzman.** 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeast. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**:124-129.
126. **Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, R. J. Hollis, and S. A. Messer.** 1998. International surveillance of bloodstream infections due to Candida species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1886-1889.
127. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, S. Gee, S. Joly, C. Pujol, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and D. R. Soll.** 1999. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* **37**:870-872.

128. **Pincus, D. H., D. C. Coleman, W. R. Pruitt, A. A. Padhye, I. F. Salkin, M. Geimer, A. Bassel, D. J. Sullivan, M. Clarke, and V. Hearn.** 1999. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3533-3539.
129. **Pinjon, E. D. Sullivan, I. Salkin, D. Shanley, and D. Coleman.** 1998. Simple, inexpensive and reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2093-2095.
130. **Polachek, I., J. Strahilevitz, D. Sullivan, S. Donnelly, I. F. Salkin, and D. C. Coleman.** 2000. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-HIV-infected patients in Israel. *J. Clin. Microbiol.* **38**:170-174.
131. **Popolo L, D. Gilardelli, P. Bonfante, and M. Vai.** 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1*delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**(2):463-469.
132. **Popolo, L., and M. Vai.** 1998. Defects in Assembly of the Extracellular Matrix Are Responsible for Altered Morphogenesis of a *Candida albicans phr1* Mutant. *J. Bacteriol.* **180**:163-166.
133. **Porta, A. M., A. M. Ramon, and W. A. Fonzi.** 1999. PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**:7516-7523.
134. **Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *MDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**:320-329.
135. **Prentice, H. G., I. M. Hann, R. Herbrecht, M. Aoun, S. Kvaloy, D. Catovsky, C. R. Pinkerton, S. A. Schey, F. Jacobs, A. Oakhill, R. F. Stevens, P. J. Darbyshire, and B. E. S. Gibson.** 1997. A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *Brit. J. Hematol.* **98**:711-718.
136. **Quindos, G., A. J. Carrillo-Munoz, M. P. Arevalo, J. Salgado, R. Alonso-Vargas, J. M. Rodrigo, M. T. Ruesga, A. Valverde, J. Peman, E. Canton, E. Martin-Mazuelos, and J. Ponton.** 2000. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemotherapy* **46**:395-401.
137. **Ramani, R. S. Gromadzki, D. H. Pincus, I. F. Salkin, and V. Chaturvedi.** 1998. Efficacy of API 20C and ID 32C Systems for Identification of Common and Rare Clinical Yeast Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3396-3398.
138. **Ramon, A. F., A. Porta, and W. A. Fonzi.** 1999. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* **181**:7524-7530.

139. **Reef, S. E., and K. H. Meyer.** 1995. Opportunistic candidal infection in patients infected with human immunodeficiency virus: prevention issues and priorities. *Clin. Infect. Dis.* **21(Suppl. 1):S99-S102.**
140. **Rentz, A. M., M. T. Halpern, and R. Bowden.** 1998. The Impact of Candidemia on Length of Hospital Stay, Outcome, and Overall Cost of Illness. *Clin. Infect. Dis.* **27:781-788.**
141. **Reynold, D. R., and J. W. Taylor.** 1991. Nucleic acids and nomenclature: Name stability under article 59, p.171-177. In D. L. Hawsworth (ed.), *Improving the stability of names: needs and options.* Regnum Veg. 123. Koelte Scientific Books, Königstein, Deutschland.
142. **Ruhnke, M., A. Schmidt-Westhause, and J. Morschhäuser.** 2000. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* **46:291-295.**
143. **Ryder, N. S., S. Wagner, and I. Leitner.** 1998. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:1057-1061.**
144. **Salkin, I. F., W. R. Pruitt, A. A. Padhye, D. Sullivan, D. Coleman, and D. H. Pincus.** 1998. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **36:1467 (Letter).**
145. **Sano, A. M. M. Villa, I. Takahashi, K. Fukushima, K. Takizawa, M. T. da Silva, J. Uno, K. Nishimura, and M. Miyaji.** 2000. Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of an HIV-positive child in Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **41:177-181.**
146. **Saporito-Irwin, S. M., C. E. Birse, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi.** 1995. *PHR1*, a pH-Regulated Gene of *Candida albicans*, Is Required for Morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **15:601-613.**
147. **Schaller, M., H-C. Korting, W. Schäfer, J. Bastert, W. Chen, and B. Hube.** 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* **34:169-180.**
148. **Schmalreck A.** 1992. Standardized susceptibility testing of fluconazole: agar dilution assay, microdilution assay, disk agar diffusion assay. *Mycoses* **35 Suppl.:9-13.**
149. **Schoofs, A., F. C. Odds, R. Colebanders, M. Ieven, and H. Goossens.** 1997. Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **16:296-300.**
150. **Sentandreu, M., M. V. Elorza, R. Sentandreu, and W. A. Fonzi.** 1998. Cloning and Characterization of *PRA1*, a gene encoding a novel pH-regulated antigen of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **180:282-289.**

151. **Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi.** 1999. *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J. Bacteriol.* **181**:5273-5279.
152. **Sheehan, D. J., C. A. Hitchcock, and C. M. Sibley.** 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:40-79.
153. **Sherman F, G. R. Fink, and J. B. Hicks.** 1986. *Methods in yeast genetics.* Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor.
154. **Sikorski, R. S., and P. Hieter.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19-27.
155. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **25**:1003-1009.
156. **Smits, G. J., J. C. Kapteyn, H. van den Ende, and F. M. Klis.** 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:348-352.
157. **Sobel, J. D.** 1999. *Candida vulvovaginitis 1999 – any more therapeutic challenges?* (abstract) ASM conference on *Candida* and *Candidiasis*, 3/1999, Charleston, USA.
158. **Soll, D. R.** 1997. Gene regulation during high frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**:279-288.
159. **Soll, D. R., B. Morrow, and T. Shrikantha.** 1993. High frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* **9**:61-65.
160. **Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**:1535-1538.
161. **Staib, F., M. Seibold, E. Antweiler, B. Fröhlich, S. Weber, and A. Blisse.** 1987. The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control, and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralbl. Bakteriolog. Microbiol. Hyg. [A]* **266**:167-177.
162. **Staib, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof and J. Morschhäuser.** 2000a. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6102-6107.
163. **Staib, P., S. Michel, G. Köhler, and J. Morschhäuser.** 2000b. A molecular genetic system for the pathogenic yeast *Candida dubliniensis*. *Gene* **25**:393-398.
164. **Staib, P., and J. Morschhäuser.** 1999. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* **42**:521-524.

165. **Stoldt, V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker, and J. F. Ernst.** 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **16**:1982-1991.
166. **Stryer, L.** 1995. *Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. Wh. H. Freeman and Company, New York, USA.
167. **Su, S. S. Y., A. P. Mitchell.** 1993a. Identification of Functionally Related Genes That Stimulate Early Meiotic Gene Expression in Yeast. *Genetics* **133**:67-77.
168. **Su, S. S. Y., A. P. Mitchell.** 1993b. Molecular characterization of the yeast meiotic regulator gene *RIM1*. *Nucleic Acids Res.* **21**:3789-3797.
169. **Sullivan D., and D. Coleman** 1998. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**(2): 329-334
170. **Sullivan D., K. Haynes, J. Bille, P. Boerlin, L. Rodero, S. Lloyd, M. Henman, and D. Coleman.** 1997 Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* **35**(4): 960-964
171. **Sullivan, D.J., T.J. Westerneng, K.A Haynes., D.E. Bennet, and D.C.Coleman.** 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141**:1507-1521
172. **Tamura, M., K. Watanabe, T. Imai, Y. Mikami, and K. Nishimura.** 2000. New PCR primer pairs specific for *Candida dubliniensis* and detection of the fungi from the *Candida albicans* clinical isolates in Japan. *Clin. Lab.* **46**:33-40.
173. **Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Peñalva, and H. N. Arst Jr.** 1995. The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**:779-790.
174. **Timmins, E. M., S. A. Jowell, B. K. Alsberg, W. C. Noble, and R. Goodacre.** 1998. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **36**:367-374.
175. **Tintelnot, K., G. Haase, M. Seibold, F. Bergmann, M. Staemmler, T. Franz, and D. Naumann.** 2000. Evaluation of Phenotypic Markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1599-1608.
176. **Treton, B., M. Lambert, A. Lépingle, S. Blanchin-Roland, and C. Gaillardin.** 1999. Two distinct *Saccharomyces cerevisiae* genes encode homologs of *Yarrowia lipolytica* Pal2p and Pal3p involved in the ambient pH signal transduction pathway. *Curr. Genet.* **35**:410.

177. **Trier, J. S., and D. J. Bjorkman.** 1984. Esophageal, gastric and intestinal candidiasis. *Am. J. Med.* **77**:39-43.
178. **Tzung, K. W., R. M. Williams, S. Scherer, N. Federspiel, T. Jones, N. Hansen, V. Bivolarevis, L. Huizar, C. Komp, R. Surzycki, R. Tamse, R. W. Davis, and N. Agabian.** 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:3249-3253.
179. **Vai M., I.Orlandi, P. Cavadini, L.Alberghina, and L. Popolo.** 1996. *Candida albicans* homologue of *GGPI/GAS1* gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Yeast* **12(4)**: 361-368
180. **Vai, M. E. Gatti, E. Lacana, L. Popolo, and L. Alberghina.** 1991. Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycosphospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* **266**:12242-12248.
181. **Vanden Bossche, H., G. Willemsens, W. Cools, H. P. Marichal, and W. F. J. Lauwers.** 1983. Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activity of N-substituted imidazoles and triazoles. *Biochem. Soc. Trans.* **11**:665-667.
182. **Velegraki, A., and M. Logotheti.** 1998. Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS-Immunol. Med. Microbiol.* **20**:239-241.
183. **Walsh, T. J., R. W. Finberg, C. Arndt, J. Hiemenz, C. Schwartz, D. Bodensteiner, P. Pappas, N. Seibel, R. N. Greenberg, S. Dummer, M. Schuster, and J. S. Holecberg.** 1999. Liposomal Amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **340**:764-771.
184. **Weidner, G., B. Steffan, and A. A. Brakhage.** 1997. The *Aspergillus nidulans* lysF gene encodes homoaconitase, an enzyme involved in the fungus-specific lysine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **255**:237-249.
185. **Weig, M., K. Haynes, T. R. Rogers, O. Kurzai, M. Frosch, and F. A. Mühlshlegel.** 2001. A *GAS1* like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology*, (zur Publikation eingereicht)
186. **Wenzel, R. P.** 1995. Nosocomial Candidemia: Risk Factors and Attributable Mortality. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1531-1534.
187. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402.
188. **White, T. C., and N. Agabian.** 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type and levels are determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* **177**:5215-5221.

189. **White, T. J., T. D. Burns, S. B. Lee, and J. W. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR protocols. Academic press, San Diego, 315-322
190. **Wiebe, V. J., and M. W. DeGregorio.** 1988. Liposome encapsulated amphotericin B: a promising new treatment for disseminated fungal infections. *Rev. Infect. Dis.* **10**:1097-1101.
191. **Willis, A. M., W. A. Coulter, C. R. Fulton, J. R. Hayes, P. M. Bell, and P. J. Lamey.** 1999. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. *Diabet-Med.* **16**:675-679.
192. **Willis, A. M., W. A. Coulter, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, J. R. Hayes, P. M. Bell, and P. J. Lamey.** 2000. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J. Oral Pathol. Med.* **29**:86-90.
193. **Wilson, R. B., D. Davis, and A. P. Mitchell.** 1999. Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through gene disruption with Short Homology Regions. *J. Bacteriol.* **181**:1868-1874.
194. **Wingard, J. R.** 1995. Importance of Candida Species Other than *Candida albicans* as Pathogens in Oncology Patients. *Clin. Infect. Dis.* **20**:115-125.
195. **Wingard, J. R., P. Kubilis, L. Lee, G. Yee, M. White, L. Walshe, E. Anaissie, J. Hiemenz, and J. Lister.** 1999. Clinical Significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1402-1407.
196. **Young, J. A. and E. Elias.** 1985. Gastro-eophageal candidiasis: diagnosis by brush cytology. *J. Clin. Pathol.* **38**:293-296.

**Anhang****A.1. In dieser Studie verwendete Primer**

Primer	Sequenz 5' → 3'	Referenz
OK3	<i>ATGTATTCATTAATCAAATCA</i>	diese Arbeit
OK4	<i>ATTTAAAAACAACGGACAT</i>	diese Arbeit
HO1	<i>GGITI(C/T)TI(C/T)GCIGGIAA(C/T)GA(A/G)GTIACIAA(C/T)</i>	diese Arbeit
HO2	<i>(A/G)CACCA(C/T)TC(A/G)IACAT(A/G)TTIATICC</i>	diese Arbeit
PHR1-P1	<i>CAGGATGCTACTATGTAG</i>	diese Arbeit
PHR1-3	<i>ACATTGCAAAGTCTTGCT</i>	diese Arbeit
PHR1-8	<i>CAAATACGGTTTGGTTCT</i>	diese Arbeit
PHR1-13	<i>CGGTATTAGTAACTTCG</i>	diese Arbeit
PHR1-P2	<i>CTGCAGGGTAGCCAAACATGTCCTAG</i>	diese Arbeit
PHR1-H1	<i>AAGCCTCAGTTTAGAGGAAACGCTGG</i>	diese Arbeit
PHR2-1	<i>CCAAGAAATTCAAGGAAT</i>	diese Arbeit
PHR2-19	<i>TCCAGGCAGAAGAACTCA</i>	diese Arbeit
PHR2-P2	<i>CTGCAGTGGTAGTACTATTCCCT</i>	diese Arbeit
PHR2-S1	<i>CCCGGGAATTGACAACGACGAC</i>	diese Arbeit
V3-11	<i>GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG</i>	Fell, 1993
V3-12	<i>GGTCCGTGTTTCAAGACG</i>	Fell, 1993
ITS1	<i>TCCGTAGGTGAACCTGCGG</i>	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	<i>TCCTCCGCTTATTGATATGC</i>	White <i>et al.</i> , 1990

**A.2. Stämme im epidemiologischen Teil der Arbeit**

Erläuterungen zu den folgenden Tabellen:

**Nr**, interne Nummer des Isolates; **Isol.-Nr**, Hannover-Isolatnummer; **isol**, Isolatnummer bei primärer Mischkultur; **C?**, endgültige Klassifikation (ca= *C. albicans*, cd= *C. dubliniensis*); **CHROMagar**, Koloniefarbe auf CHROMagar Candida; **45°C WT**, Wachstum bei 45°C auf YPD-Platten; **Chl-sp.**, Chlamydosporenmorphologie; **PCR**, diagnostische PCR mit OK3/OK4; **MIC's**, Resistenztestergebnisse (AB, Amphotericin B, Flu, Fluconazol, Itra, Itraconazol); **V3**, 25s rDNA V3 Sequenz (+, sequenziert und ausgewertet, a, d, Klassifizierung als *C. albicans*, *C. dubliniensis*); **ITS**, ITS Sequenzierung, A, forward, B, reverse, ok, endgültig ausgewertet; **HD Nummern**, fortlaufende Numerierung der *C. dubliniensis* Isolate; **HA Nummern**, fortlaufende Nummerierung der *C. albicans* Isolate. **nd**, nicht bestimmt.

## Oropharyngeale Isolate

Nr.	Isol.-Nr.	isol.	C?	CHROMagar	45°C WT	Chl-sp.	PCR	MIC's			V3		ITS			comments
								AB	Flu	Itra	seq	id	A	B	ok	
1	88326	II	ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.125	+	a	+	+	+	HA-01
2	85733	I	cd	dunkelgrün	-	++	-	0.125	0.5	0.125	+	d	+	+	+	HD-01
4	85734	I	cd	moosgrün	-	+++1	-	0.125	0.5	0.125	+	d	+	+	+	HD-02
5	83753	I	cd	dunkelgrün	-	+/-	-	0.125	0.5	0.125	+	d	+	+	+	HD-03
7	90353		ca	hellgrün	+	+	+	0.25	0.5	0.25	+	a	+	+	+	HA-02
8	92682		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-03
9	93155	II	ca	uneinheitl. grün	+	+/-	+	0.5	0.5	0.125	+	a	+	+	+	HA-04
10	96287		ca	hellgrün	0	++	+	0.5	0.5	0.25	+	a	+	+	+	HA-05
11	96569	I	ca	hellgrün	0	++	+	0.25	0.5	0.125	+	a	+	+	+	HA-06
12	96569	II	ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	0.5	0.125	+	a	+	+	+	HA-07
13	98750		ca	hellgrün	+	++	+	0.5	1	0.5	+	a	+	+	+	HA-08
14	98770		ca	hellgrün	+	+/-	+	0.5	1	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-09
15	99074		ca	hellgrün	-	+/-	+	0.5	8	0.5	+	a	nd	nd	nd	HA-10
16	99235	II	ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	1	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-11
17	99468	II	ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	1	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-12
18	100307	I	ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.125	+	a	+	+	+	HA-13
19	100307	II	cd	hellgrün	-	+++1	-	0.25	0.5	0.125	+	d	+	+	+	HD-04
21	100432	II	ca	dunkelgrün	-	+	+	0.5	2	0.25	+	a	+	+	+	HA-15
22	100435	I	ca	dunkelgrün	-	+/-	+	0.5	1	0.25	+	a	+	+	+	HA-16
23	100435	II	ca	dunkelgrün	-	+/-	+	0.25	2	0.5	+	a	+	+	+	HA-17
24	100660	I	cd	dunkelgrün	-	++	-	0.25	1	0.5	+	d	+	+	+	HD-05
25	100660	II	cd	hellgrün	-	++	-	0.5	2	32	+	d	+	+	+	HD-06
26	100661	I	ca	hellgrün	-	+	+	0.5	2	32	+	a	+	+	+	HA-18
27	100803		ca	dunkelgrün	+	+/-	+	0.5	0.5	0.25	+	a	+	+	+	HA-19
28	101031		ca	hellgrün	0	++	+	0.5	2	32	+	a	+	+	+	HA-20
29	101163		cd	dunkelgrün	0	+	-	0.125	4	0.25	+	d	+	+	+	HD-07
30	101343		ca	hellgrün	+	+/-	+	0.5	128	16	+	a	+	+	+	HA-21
31A	101344		ca	hellgrün	+	+	+	0.125	0.5	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-22
31B	101353		ca	hellgrün	+	++	+	0.5	128	16	+	a	+	+	+	HA-23

Nr.	Isol.-Nr.	isol.	C?	CHROMagar	45°C WT	Chl-sp.	PCR	MIC's			V3		ITS			comments
								AB	Flu	Itra	seq	id	A	B	ok	
32	101354		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	<b>128</b>	<b>16</b>	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-24
33	101355		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	<b>128</b>	<b>16</b>	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-25
34	100791		ca	dunkelgrün	-	+	+	0.5	<b>16</b>	0.5	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-26
35	7109	II	cd	dunkelgrün	-	++	-	0.125	0.5	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-08</b>
37	102020		ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	0.5	0.25	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-27
38	102021		ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	0.5	0.5	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-28
39	102241	I	ca	hellgrün	+	++	+	0.5	0.5	0.25	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-29
40	102569		ca	hellgrün	+	++1	+	0.25	0.5	0.125	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-30
41	104795	I	cd	dunkelgrün	-	+++1	-	0.125	0.5	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-09</b>
42	104796		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	<b>128</b>	4	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-31
43	105045		cd	dunkelgrün	-	++1	-	0.25	1	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-10</b>
44	106003		cd	dunkelgrün	-	++1	-	0.25	1	0.5	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-11</b>
45	109659		cd	grün	-	++	-	0.125	1	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-12</b>
46	109932		cd	dunkelgrün	-	++1	-	0.25	<b>8</b>	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-13</b>
47	110049		ca	hellgrün	+	++1	+	0.5	<b>128</b>	<b>64</b>	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-32
49	111374		cd	grün	-	++	-	0.25	2	0.125	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-14</b>
50	111629		cd	dunkelgrün	-	+++1	-	0.125	1	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-15</b>
51	109061		cd	hellgrün	-	++1	-	0.5	2	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-16</b>
52	109514		ca	dunkelgrün	-	+++1	-	0.5	2	0.5	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-17</b>
54	117758		cd	dunkelgrün	-	+++1	-	0.25	1	0.25	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-18</b>
55	118555		ca	hellgrün	+	++1	+	0.5	0.5	0.125	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-33
56	120367		ca	hellgrün	+	++	+	0.5	0.5	0.5	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-34
57	120789	II	cd	dunkelgrün	-	+++1	-	0.25	<b>8</b>	2	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-19</b>
58	121398		ca	hellgrün	0	+	+	0.5	0.5	0.125	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-35
59	121509		ca	hellgrün	0	+	+	0.5	0.5	0.5	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-36
60	123000		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	1	0.5	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-37
61	123531		ca	hellgrün	+	++1	+	0.5	<b>128</b>	<b>32</b>	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-38
62	125130	I	cd	dunkelgrün	-	++	-	0.125	1	1	+	<b>d</b>	+	+	+	<b>HD-20</b>
63	125965		ca	hellgrün	-	+	+	0.5	4	0.5	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-39
64	126577	I	ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.125	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-40
65	126591		ca	dunkelgrün	+	+/-	+	0.5	0.5	0.125	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-41
66	126683		ca	hellgrün	+	+/-	+	0.5	<b>64</b>	<b>8</b>	+	<b>a</b>	nd	nd	nd	HA-42
67	126787	I	ca	hellgrün	+	+	+	0.25	0.5	0.125	+	<b>a</b>	+	+	+	HA-43

Nr.	Isol.-Nr.	isol.	C?	CHROMagar	45°C WT	Chl-sp.	PCR	MIC's			V3		ITS			comments
								AB	Flu	Itra	seq	id	A	B	ok	
68	126788	II	ca	dunkelgrün	+	++	+	0.25	0.5	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-44
69	126787	II	ca	hellgrün	+	++	+	0.25	0.5	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-45
70	126788	I	ca	hellgrün	+	+/-	+	1	0.5	2	+	a	nd	nd	nd	HA-46
71	126826	I	ca	hellgrün	+	++	+	0.5	0.5	1	+	a	+	+	+	HA-47
72	127145		ca	hellgrün	+	++	+	0.5	0.5	0.25	+	a	+	+	+	HA-48
73	127285		ca	dunkelgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.125	+	a	+	+	+	HA-49
74	127287		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.25	+	a	+	+	+	HA-50
75	127432		ca	hellgrün	0	+	+	0.5	<b>64</b>	4	+	a	nd	nd	nd	HA-51
76	127617		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	1	0.5	+	a	+	+	+	HA-52
77	127779		cd	hellgrün	-	+++1	-	0.125	0.5	0.125	+	d	+	+	+	<b>HD-21</b>
78	128083		ca	hellgrün	-	+++1	+	0.5	<b>16</b>	<b>8</b>	+	a	+	+	+	HA-53
79	128084	I	ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	1	+	a	nd	nd	nd	HA-54
80	128120		ca	hellgrün	+	+++1	+	1	1	4	+	a	+	+	+	HA-55
81	128146		ca	dunkelgrün	+	++	+	0.5	0.5	4	+	a	nd	nd	nd	HA-56
82	128461		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	<b>64</b>	4	+	a	nd	nd	nd	HA-57
84	128467		ca	dunkelgrün	+	+++1	+	0.5	2	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-59
85	128773		ca	dunkelgrün	+	+++1	+	0.5	0.5	0.5	+	a	nd	nd	nd	HA-60
86	129138		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-61
88	129436		ca	hellgrün	+	++	+	0.5	1	1	+	a	+	+	+	HA-62
89	129949		ca	hellgrün	-	+++1	+	1	0.5	0.5	+	a	nd	nd	nd	HA-63
90	130147		ca	hellgrün	+	+	+	1	0.5	1	+	a	nd	nd	nd	HA-64
91	130227		ca	hellgrün	+	++	+	1	<b>32</b>	<b>16</b>	+	a	nd	nd	nd	HA-65
92	130391		ca	hellgrün	+	+/-	+	1	<b>16</b>	<b>16</b>	+	a	nd	nd	nd	HA-66
93	130797		ca	hellgrün	0	+++1	+	0.5	0.5	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-67
94	130920		ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	0.5	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-68
95	131132		ca	hellgrün	+	+/-	+	0.5	1	4	+	a	nd	nd	nd	HA-69
96	131636		ca	hellgrün	+	+/-	+	0.5	0.5	4	+	a	nd	nd	nd	HA-70
97	131788		ca	hellgrün	+	+/-	+	1	0.5	2	+	a	nd	nd	nd	HA-71
98	131803		ca	hellgrün	0	++	+	0.5	<b>64</b>	<b>8</b>	+	a	nd	nd	nd	HA-72
99	131921		ca	hellgrün	0	+/-	+	0.5	<b>16</b>	1	+	a	+	+	+	HA-73
100	132016		ca	hellgrün	0	+++1	+	0.5	1	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-74
101	132017		ca	hellgrün	0	+++1	+	0.5	1	0.5	+	a	nd	nd	nd	HA-75
102	132018		ca	hellgrün	+	+++1	+	0.5	0.5	0.5	+	a	nd	nd	nd	HA-76

Nr.	Isol.-Nr.	isol.	C?	CHROMagar	45°C WT	Chl-sp.	PCR	MIC's			V3		ITS			comments
								AB	Flu	Itra	seq	id	A	B	ok	
103	132448		ca	hellgrün	+	+	+	0.5	0.5	2	+	a	nd	nd	nd	HA-77
104	132909		ca	hellgrün	0	+	+	0.5	0.5	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-78
105	133451		ca	hellgrün	+	+	+	1	0.5	0.25	+	a	nd	nd	nd	HA-79
106	133637		ca	hellgrün	+	+	+	1	1	0.5	+	a	nd	nd	nd	HA-80
107	133791		ca	hellgrün	-	+	+	1	<b>16</b>	2	+	a	nd	nd	nd	HA-81
108	134250		ca	hellgrün	-	++	+	1	<b>32</b>	1	+	a	nd	nd	nd	HA-82
109	134614		ca	hellgrün	-	+/-	+	1	1	0.125	+	a	nd	nd	nd	HA-83



## A.3. Patientenzugehörigkeit der Isolate

## HIV Patienten

Patient	Isolate	
	C. albicans	C. dubliniensis
1		HD-03
2		HD-01 HD-02
3	HA-01	
4	HA-02	
5	HA-03	
6	HA-04	
7	HA-05	
8	HA-06 HA-07	
9	HA-08	
10	HA-09 HA-11 HA-12	
11	HA-10	
12	HA-13 HA-19	HD-04 HD-18
13		HD-05 HD-06 HD-21
14	HA-14 HA-15 HA-16 HA-17 HA-26	
15	HA-18	
16	HA-21 HA-22 HA-23 HA-23 HA-24 HA-25	
17		HD-07
18	HA-28	
19	HA-29	
20	HA-27	
21	HA-30	
22		HD-10
23	HA-31	
24		HD-09
25		HD-11
26		HD-08 HD-16
27		HD-17 HD-12 HD-13
28	HA-32	
29		HD-14
30		HD-15
31	HA-33	

Patient	Isolate	
	C. albicans	C. dubliniensis
32	HA-34	
33		HD-19
34	HA-35 HA-36	
35	HA-37 HA-20	
36	HA-38	
37		HD-20
38	HA-47	
39	HA-41	
40	HA-69 HA-77 HA-80	
41	HA-70	
42	HA-72	
43	HA-74	
44	HA-83	

## Transplantatpatienten

Patient	Isolate	
	C. albicans	C. dubliniensis
1	HA-39	
2	HA-42 HA-51 HA-57	
3	HA-40	
4	HA-43 HA-44 HA-45 HA-46 HA-50	
5	HA-48	
6	HA-49 HA-64	
7	HA-52 HA-54	
8	HA-55	
9	HA-53	
10	HA-56	
11	HA-60	
12	HA-58 HA-59 HA-65	
13	HA-61 HA-62 HA-68 HA-78	
14	HA-63 HA-71 HA-73 HA-81	
15	HA-67	
16	HA-66	
17	HA-82	

## PUBLIKATIONS- UND VORTRAGSLISTE

Teile der Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht

1. **Klinik und Pathogenese der Candidose.** (1998) Werner J. Heinz, Abdelmalic El Barkani, Stephanie Theiß und Oliver Kurzai, Hygiene und Mikrobiologie 2/98.
2. **Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated *PHR-1/PHR-2* genes of *Candida albicans*.** (1999) O. Kurzai, W.J. Heinz, D.J. Sullivan, D.C. Coleman, M. Frosch and F.A. Mühlischlegel, J. Clin. Microbiol. 37, 1587-1590.
3. **ASM-Konferenz Candida und Candidose.** (1999) O. Kurzai, W. J. Heinz und F. Mühlischlegel, Hygiene und Mikrobiologie 2/99:15-18.
4. **ASM Conference Candida and Candidiasis.** (1999) O. Kurzai, W. J. Heinz, and F. A. Mühlischlegel. Mycoses 42, 427-430.
5. **Dominant active alleles of *RIM101/PRR2* bypass the pH restriction on filamentation of *C. albicans*.** (2000) A. El Barkani, O. Kurzai, W. A. Fonzi, A. Ramon, A. Porta, M. Frosch, and F. A. Mühlischlegel. Mol. Cell. Biol. 20:4635-4647.
6. **Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *C. dubliniensis* and *C. albicans*.** (2000) W. J. Heinz, O. Kurzai, A. A. Brakhage, W. A. Fonzi, H.-C. Korting, M. Frosch and F. A. Mühlischlegel. Int. J. Med. Microbiol. 290:231-238.
7. ***Candida dubliniensis* – Mikrobiologische Identifizierung und Epidemiologie.** (2000) O. Kurzai, M. Frosch, und F. A. Mühlischlegel. Hygiene und Mikrobiologie 2/00:18-19.
8. **Molecular and Phenotypic Identification of the Yeast Pathogen *C. dubliniensis*.** (2000) O. Kurzai, H.C. Korting, D. Harmsen, W. Bautsch, M. Molitor, M. Frosch, and F. A. Mühlischlegel. J. Mol. Med. 78:521-529.

9. **A *GAS1* like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*.** (2001) M. Weig, K. Haynes, T. R. Rogers, O. Kurzai, M. Frosch, and F. A. Mühlschlegel. *Microbiology*. **147**:2007-2019.
10. **In vitro Comparative Activity of FK 463, Fluconazole, Flucytosine, Amphotericin B, and voriconazole against Clinical *C. albicans* and *C. dubliniensis* isolates and a comparison of RPMI2%, AM3 2% and HR medium.** (2001) F. M. C. Müller, O. Kurzai, W. Bautsch, J. Hacker, M. Frosch, C. P. Speer, F. Mühlschlegel. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:713-715.
11. **Adaptation of Fungi to Alterations of the Environmental pH.** (2001) O. Kurzai, A. El Barkani und F. A. Mühlschlegel. In *Principles in Fungal Pathogenesis* (eds. R. Cihlar and R. Calderone). Marcel Dekker, New York, USA. pp139-160.

Teile der Arbeit wurden in folgenden Kongressbeiträgen präsentiert

1. **A System of pH-regulated genes similar to *C. albicans* *PHR1/PHR2* in *C. dubliniensis*.** (Vortrag) (1998) O. Kurzai, M. Frosch und F. Mühlschlegel, Interdisciplinary Forum on Candidosis, Graduate Students Session, 17.4.- 18.4.98, Würzburg.
2. ***PHR1/2* homologe Gene bei *Candida dubliniensis* können zur Abgrenzung dieser Spezies von *Candida albicans* beitragen.** (Vortrag) (1998), O. Kurzai, M. Frosch und F. Mühlschlegel, 32. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen mykologischen Gesellschaft e.V. (DMyk), 17.9.98 - 20.9.98, Frankfurt/Oder.
3. **Ein System pH-regulierter Gene mit Homologie zu den PHR-Genen von *Candida albicans* bei dem humanpathogenen Hefepilz *Candida dubliniensis*** (Poster) (1998), O. Kurzai, M. Frosch und F. Mühlschlegel, 50. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und 25. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie, 4.10.-9.10.98, Berlin.
4. **Characterization of pH-regulated genes in *Candida dubliniensis* and their use as means of differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*,** (Poster) (1999), O. Kurzai, W. J. Heinz, W. Fonzi, D. Sullivan, D. Coleman, M. Frosch

und F. Mühlshlegel, Candida and Candidosis Meeting of the American Society of Microbiology, 1.3.99 - 4.3.99, Charleston SC, USA.

5. **Identification of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples using a novel PCR-Test**, (Vortrag) (1999), O. Kurzai, M. Frosch, D. Harmsen, W. Bautsch, F. Mühlshlegel; 5th Congress of the European Confederation of Medical Mycology and 33. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyk), 3.6.99-6.6.99, Dresden.
6. **pH-regulated dimorphism is controlled by dominant active mutations of the *C. albicans* pH-response regulator *PRR2***. (2000) A. El Barkani, O. Kurzai, W. A. Fonzi, M. Frosch, and F. A. Mühlshlegel. 14th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), 8.5.-12.5.2000, Buenos Aires, Argentinien.
7. ***Candida albicans* – *Candida dubliniensis*: Was macht den Unterschied?** (Vortrag) (2000) O. Kurzai, H-C. Korting, D. Harmsen, W. Bautsch, M. Molitor, M. Frosch, und F. A. Mühlshlegel. 34. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, 14.9.-16.9.2000, Berlin.
8. **In vitro Comparative Activity of FK 463, Fluconazole, Flucytosine, Amphotericin B, and voriconazole against Clinical *C. albicans* and *C. dubliniensis* isolates and a comparison of RPMI2%, AM3 2% and HR medium**. (2000) F. M. C Müller, O. Kurzai, W. Bautsch, J. Hacker, M. Frosch, C. P. Speer, F. Mühlshlegel. 40th Inter-science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapie (ICAAC), 17.9.-20.9.2000, Toronto, Canada.

**Sonstige Kongressbeiträge des Autors**

9. **Mechanical Stimulation and B2 but not B1 receptor agonist lead to Ca<sup>2+</sup> increase in sensory neurons**. (2000) M. Brand, A. Klusch, O. Kurzai, M. Valdeolmillos, R. F. Schmidt, and M. Petersen. 79th Congress of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, 19.3.-22.3.2000, Ulm.

## DANKSAGUNG

Viele Namen wären hier zu nennen und viele kleinere und größere Beiträge zu würdigen. Dank gebührt in erster Linie allen Mitarbeitern und Kollegen in der Arbeitsgruppe Candida am Institut für Hygiene und Mikrobiologie. Michael Weig und Malek El Barkani, die von Anfang an neben mir an den Laborbänken standen, dann Werner Heinz, Stefanie Müksch, Barbara Landeck und schließlich Bianca Günther, Ben Junginger und Jürgen Ott. Hervorzuheben ist hier Werner Heinz, der an Teilen des Projektes *Candida dubliniensis* mit mir zusammengearbeitet hat. Thi Thanh Nguyen Hang, die mich eingearbeitet und mit den Grundlagen der molekularbiologischen Methoden vertraut gemacht hat, studiert mittlerweile Medizin, mein Dank geht also an eine Kommilitonin, der ich alles Gute wünschen möchte. Es ist mir aber ausdrücklich wichtig, allen Mitarbeitern am Institut für Hygiene und Mikrobiologie zu danken. Es ist keineswegs selbstverständlich, dass ein Medizindoktorand eine so bereitwillige Aufnahme und hilfsbereite Wertschätzung von allen Seiten erfährt, wie ich das stets getan habe. Dies gilt in gleicher Weise für die Mitarbeiter in der Forschung, als auch für die Assistentinnen in der Routinediagnostik und Kursvorbereitung, die ich bei Famulatur oder Kursbetreuung kennen gelernt habe.

Für die Zusammenarbeit an Teilen des Projektes *C. dubliniensis* möchte ich mich bei Prof. Dr. Korting (München), Prof. Dr. Brakhage (Hannover) und Dr. Molitor (Bornheim-Hersel) bedanken.

Prof. Dr. Matthias Frosch hat mir nicht nur die Erstellung dieser Arbeit an seinem Institut ermöglicht, sondern mich auch in anderen Fragen immer unterstützt. Und so habe ich in meiner Zeit nicht nur viel über Candida gelernt, sondern auch einen Einblick in die mikrobiologische Diagnostik gewonnen und die Möglichkeit gehabt, in verschiedenen Lehrveranstaltungen mitzuwirken.

Mein Betreuer Fritz Mühlshlegel hat während dieser Arbeit viele verschiedene Rollen gespielt. Er hat mich ermutigt wenn wieder mal etwas nicht geklappt hatte und mir eine Fülle von Eindrücken aus der modernen mykologischen Forschung verschafft. Er hat mit mir Projekte diskutiert und Publikationen geschrieben. Unvergesslich wird für mich sicher die Reise zum ASM-Kongress nach Charleston bleiben, die er ermöglicht hat.

Ein großer Dank geht an meine Familie, meine Freundin und nicht zuletzt an meine Lerngruppe, die mich während des Studiums unterstützt und ermutigt haben.

Oliver Kurzai

## LEBENS LAUF

*Name :* Ralf Oliver Kurzai

*Geburtstag :* 23. August 1975

*Geburtsort :* Würzburg

*Eltern/Geschwister :* Klaus Kurzai (Studiendirektor, D, G, Ek)  
Silke Kurzai geb. Gehlhar  
  
Bernd Kurzai (Student der Rechtswissenschaften)

*Anschrift :* Brücknerstraße 7; 97080 Würzburg; Tel.: 0931/286924

*Schulbesuch :* 1981 - 1985 Grundschule in Bad Königshofen im Grabfeld  
1985 - 1994 Gymnasium in Bad Königshofen im Grabfeld  
1994 Abitur (M, Ch, D, G), Gesamtnote: sehr gut (1,0)

*Studium :* WS 1994/95 Beginn des Medizinstudiums in Würzburg

Jan. 1995 Aufnahme in die Studienstiftung des Dt. Volkes

Aug.-Okt. 96 Pflegepraktikum im Kreiskrankenhaus  
Bad Königshofen (Chirurgie/Innere Medizin)

Aug. 1996 Ärztliche Vorprüfung (Note gut 1,66)

März 1998 Famulatur am Kreiskrankenhaus Traunstein (Lehr-  
krankenhaus der Univ. München)

Aug.-Okt 1998 Famulatur und Auslandsaufenthalt in Australien  
(Bunbury, Western Australia)

Sept. 1997 Erstes Staatsexamen (Note: gut 2,0)

Promotionsarbeit und Famulatur am Institut für Hy-  
giene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

März 2000 Zweites Staatsexamen (Note: sehr gut 1,33)

April 2000 Praktisches Jahr (Chirurgie - Innere Medizin  
Humangenetik)

Mai 2001 Drittes Staatsexamen (Note: sehr gut 1,0)

*Fremdsprachen:* sehr gute Englischkenntnisse in Wort und Schrift

Würzburg, den 14. Februar 2002,

Oliver Kurzai