

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Prof. Dr. med. M. Frosch

Vergleichende Analyse
zwischen
Candida albicans* und *Candida dubliniensis
unter besonderer Berücksichtigung des
Transkriptionsfaktors Rim101

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Monika Wicker

aus Weiler im Allgäu

Würzburg, September 2004

Referent: PD Dr. F. Mühschlegel

Koreferent: Prof. Dr. M. Frosch

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Candida dubliniensis</i>	1
1.1.1 Biologie	1
1.1.2 Identifikation	3
1.1.3 Epidemiologie und Klinik	4
1.1.4 Therapie und Resistenzen	6
1.2 Dimorphismus bei <i>C.albicans</i>	6
1.2.1 pH-induzierter Dimorphismus	7
1.2.1.1 Rim101 und die Rim-Kaskade	7
1.2.1.2 Rim101-Aktivierung	9
1.2.1.3 Konstitutiv aktives Rim101	10
1.2.1.4 <i>RIM101</i> -Nullmutanten	11
1.2.2 CO ₂ -induzierte Filamentierung	12
1.3 Chlamyosporen	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterial	15
2.1.3. Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	16
2.2 Stämme	16
2.2.1 Bakterien	16
2.2.2 Candida-Stämme	17
2.2.2.1 <i>Candida albicans</i> -Stämme	17
2.2.2.2 <i>Candida dubliniensis</i> -Stämme	18
2.2.2.3 Candida-Patientenisolate	18
2.3 Plasmide und Oligonukleotide	22
2.3.1 Plasmide	22
2.3.2 Oligonukleotide	23

Inhaltsverzeichnis

2.4 Anzucht und phänotypische Methoden	24
2.4.1 Anzucht von Bakterien	24
2.4.2 Anzucht von Hefen	24
2.4.3 Filamentierungsverhalten in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur: Medium 199	26
2.4.4 Filamentierung und Chlamydosporenbildung auf Reis-Tween-Agar	27
2.4.5 Färbung auf CHROMagar Candida	27
2.4.6 Koloniemorphologie auf Staibagar	28
2.4.7 Wachstum bei 45°C	28
2.4.8 CO ₂ -Einfluss auf die Koloniemorphologie bei Verwendung besonderer Medien	29
2.5 Molekularbiologische Methoden	30
2.5.1 Modifizierung von DNA-Fragmenten	30
2.5.1.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen	30
2.5.1.2 Dephosphorilierung	30
2.5.1.3 Ligation	30
2.5.1.4 Aufreinigung	31
2.5.2 Agarose - Gelelektrophorese	32
2.5.3 DNA-Amplifikation mittels PCR	33
2.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA	34
2.5.4.1 nach Laborprotokoll: Schnellpräparation von Plasmid-DNA	34
2.5.4.2 Plasmid-Mini-Prep nach QIAGEN	35
2.5.4.3 QIAGEN Plasmid Midi Kit	36
2.5.5 DNA-Amplifikation in Bakterien	36
2.5.5.1 Konstruktion von Plasmiden	36
2.5.5.2 Transfer von Plasmiden in Bakterien	37
2.5.5.2.1 Elektroporation	37
2.5.5.2.2 chemische Induktion der Plasmidaufnahme	37
2.5.5.3 Sonderform: <i>TOPO-TA-Cloning[®] Kit</i>	37
2.5.6 Präparation genomischer DNA aus Candida-Spezies	38
2.5.7 Präparation der Gesamt-RNA aus Candida-Spezies	39
2.5.7.1 nach Laborprotokoll	39
2.5.8 Transformation in Candida-Spezies	41

Inhaltsverzeichnis

2.5.8.1	Lithiumacetat-Methode	41
2.5.8.2	Spheroplasten Transformation	42
2.5.9	Radioaktive Verfahren	43
2.5.9.1	Markieren der Sonden	43
2.5.9.2	Northern Blot	44
2.5.9.3	Southern Blot	45
2.5.10	DNA-Sequenzierung	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	<i>C.dublinsiensis-RIM101</i>	46
3.1.1	Klonierung und Sequenzierung	46
3.1.2	Aktivität von <i>C.dublinsiensis-RIM101</i> in <i>C.albicans</i>	49
3.2	CEM 8: Eine <i>C.albicans</i>-Mutante mit multiplen Kopien des verkürzten <i>C.albicans-RIM101</i>	52
3.2.1	Phänotypische Charakteristika von CEM 8	52
3.2.2	Erneute Transformation	54
3.2.3	RIM101-Expressionsanalyse	56
3.2.4	Phänotypischer Array	57
3.3	Differierendes Filamentierungsverhalten von <i>C.dublinsiensis</i> und <i>C.albicans</i> auf Kochblutagar bei erhöhtem CO₂-Gehalt	58
4.	Diskussion	63
4.1	Rim101-abhängige Phänotypen bei <i>C.albicans</i> und <i>C.dublinsiensis</i>	63
4.1.1	Klonierung und Identifizierung von <i>C.dublinsiensis-RIM101</i>	63
4.1.2	Bedeutung der Sequenzunterschiede von <i>C.dublinsiensis</i> und <i>C.albicans-RIM101</i> für die pH-Signaltransduktion bei <i>C.dublinsiensis</i>	64
4.1.3	Bedeutung von Rim101 für die Ausprägung <i>C.dublinsiensis</i> -spezifischer Phänotypen	66
4.1.4	Mögliche molekulare Auswirkungen der verstärkten <i>RIM101</i> -Expression unter Berücksichtigung der Ergebnisse des phänotypischen Arrays	68

Inhaltsverzeichnis

4.1.5	Unterschiedliche Auswirkungen der verstärkten <i>RIM101</i> -Expression auf das Filamentierungsverhalten von <i>C.albicans</i> und <i>C.dublinsiensis</i>	69
4.2	Differierendes Filamentierungsverhalten von <i>C.albicans</i> und <i>C.dublinsiensis</i>	72
4.2.1	Bedeutung der Inkubationsbedingungen für die differentielle Filamentierung	73
4.2.2	Eignung als Testverfahren	75
4.2.3	Bedeutung für die Pathogenitätsforschung	77
5.	Zusammenfassung	82
6.	Anhang	83

1. Einleitung

1.1 *Candida dubliniensis*

Vertreter der relativ neuen Spezies *C.dubliniensis* wurden bis vor wenigen Jahren auf Grund enger Verwandtschaft und phänotypischer Ähnlichkeit zu *C.albicans* als atypische Stämme dieser Spezies angesehen.

Erst 1995 gelang es einer Gruppe irischer Wissenschaftler um D. C. Coleman, eine homogene Gruppe solch atypischer *C.albicans*-Stämme, die alle der Serogruppe A angehörten, durch genaue phänotypische und vor allem genetische Untersuchungen als eigenständige Spezies zu identifizieren (80). Nach dem Ort der Erstbeschreibung erhielt sie die Bezeichnung *C.dubliniensis*.

1.1.1 Biologie

C.dubliniensis ist ein dimorpher Hefepilz mit einer Blastokonidiengröße von 3 - 7 x 3 - 14 µm. Unter den normalen Laborbedingungen wächst er als Sprosszelle, kann aber wie *C.albicans* als Reaktion auf eine Veränderung der Kulturbedingungen wie Temperaturanstieg, pH-Alkalisierung oder Zugabe von Serum in eine myzeliale Wachstumsform übergehen, wobei die Keimschlauchbildung bei *C.dubliniensis* aber langsamer abläuft (8).

Auf Reis-Tween-Agar bei Inkubation für 48 h - 72 h bei 25°C und mikroaerophilen Bedingungen bildet *C.dubliniensis* neben *C.albicans* als einziger Vertreter der Gattung *Candida* Chlamydosporen (76). Diese dickwandigen, lichtbrechenden kugelförmigen Strukturen sitzen am Ende kurzer, stark verzweigter Pseudohyphen (7), charakteristischerweise angeordnet als Dupletts oder Triplets auf einer Trägerzelle. Diese Anordnung ist typisch für *C.dubliniensis* und lässt, wenn in dieser Ausprägung vorhanden, eine Unterscheidung gegenüber *C.albicans* zu, der lange, kaum verzweigte Filamente mit einzelnen Chlamydosporen an den Spitzen bildet (77; 80; 83).

Auch auf Staibagar, einem Medium, das Samen von *Guizotia abyssinica* enthält und primär zur Kryptokokkendiagnostik konzipiert war, wächst *C.dubliniensis* filamentös und bildet Chlamydosporen. Im Gegensatz dazu sind die Kolonien von *C.albicans* glatt begrenzt, wie in Abb. 1.1 a) zu sehen ist. Dieser Effekt zeigt sich am deutlichsten nach 3 - 4-tägiger Inkubation bei 30°C (51; 77).

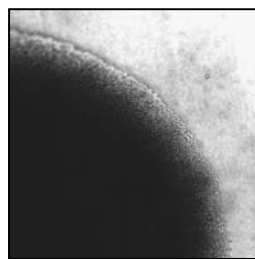
Ein weiteres phänotypisches Charakteristikum von *C.dubliniensis* ist sein Wachstumsdefizit bei Temperaturen ab 42°C, das in Abb. 1.1 b) dargestellt ist. Es steht im Gegensatz zu gutem Wachstum bei 30°C und 37°C (31; 80; 83; 85).

Zwei Indikatormedien zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen *C.dubliniensis* und *C.albicans*. Beide sind aber nur für die Erstkultur verwertbar, da *C.dubliniensis* durch Subkultivierung und Lagerung bei -80°C seine typischen Eigenschaften verliert.

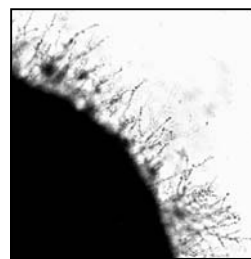
CHROMagar Candida enthält ein Gemisch aus chromogenen Substanzen, die *C.dubliniensis*-Kolonien eine dunkelgrüne Färbung verleihen, während *C.albicans*-Kolonien blassgrün erscheinen (73; 83). In Abb. 1.1 c) ist dieser Unterschied zu sehen.

Auf Methylblau-Sabouraud-Agar fluoresziert *C.albicans* gelb, wenn er mit Woodlicht, einem langwelligen UV-Licht bestrahlt wird. *C.dubliniensis* hingegen zeigt keine Fluoreszenz (73; 82).

Abb. 1.1: Speziespezifische Phänotypen bei *C.albicans* und *C.dubliniensis*

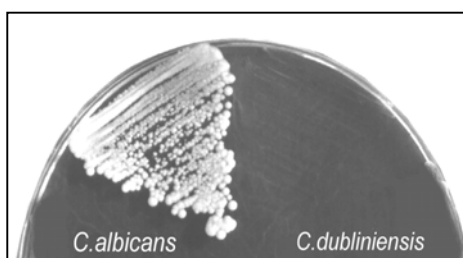


C.albicans



C.dubliniensis

a) Filamentierung und Chlamydo-sporenbildung auf Staibagar



b) Wachstum bei 45°C



c) Koloniefärbung auf CHROMagar

Biochemisch fällt ein von *C.albicans* abweichendes Kohlenhydrat-Assimilationsmuster auf, das auch Anlass war, diese Stämme als „atypische *C.albicans*-Stämme“ zu klassifizieren. Den meisten *C.dubliniensis*-Stämmen fehlt die Fähigkeit α -Methyl-D-Glucosid, Xylose und DL-Laktat zu assimilieren; die Assimilation von Trehalose und Palatinose ist variabel (31; 62; 75). Insgesamt zeigen die Ergebnisse starke Schwankungen, zurückzuführen einer-

seits auf eine Variabilität der Assimilationsmuster innerhalb der Spezies, aber auch auf unterschiedliche Testsysteme und Inkubationsdauern.

Ein hingegen recht stabiles biochemisches Merkmal ist die fehlende Aktivität der intrazellulären β -Glucosidase (33; 34; 73; 83).

Auf Genomebene findet sich für *C.dubliniensis* eine deutlich von *C.albicans* unterscheidbare Organisation, die ausschlaggebend war für die Klassifizierung als eigene Spezies.

Die elektrophoretische Karyotypisierung liefert für *C.dubliniensis* 9 - 10 unterschiedlich große chromosomale Banden, von denen 1 - 2 kleiner sind als 1 MB, während *C.albicans* nur 7 Banden besitzt, alle größer als 1 MB (80).

Auch Restriktionsverdau der genomischen DNA, z.B. mit *Hinf I* oder *Eco R I*, sowie RAPD-Patterns oder die Multilocus Enzyme Electrophoresis zeigen für *C.dubliniensis* spezifische Muster (80).

Sequenzierung eines 500 bp-Abschnitts der V3-variablen Region der großen ribosomalen Untereinheit ergibt identische Ergebnisse innerhalb der Spezies und ist mit 14 - 15 Basenunterschieden deutlich verschieden zu *C.albicans* (79).

Zwei weitere Eigenheiten von *C.dubliniensis* sind noch von besonderem Interesse, da sie potentielle Virulenzfaktoren betreffen.

So ist die Sekretion extrazellulärer Proteinasen und alkalischer Phosphatase bei *C.dubliniensis* höher als bei *C.albicans* unter gleichen Bedingungen (42; 83).

Auch die Adhärenz an Mundschleimhautepithel ist nach Kultur auf Glucose bei *C.dubliniensis* stärker als bei *C.albicans* (24; 42).

Dies würde für eine höhere Virulenz von *C.dubliniensis* sprechen, für die es aber *in vivo* keine Hinweise gibt.

Andererseits hat *C.albicans* sowohl in Flüssigkultur als auch innerhalb eines Biofilms gegenüber *C.dubliniensis* Wachstumsvorteile und dominiert in Mischkulturen somit nach kurzer Zeit (32).

1.1.2 Identifikation

Bislang waren alle Untersuchungen der Biologie von *C.dubliniensis* darauf ausgerichtet, möglichst einfache und verlässliche Differenzierungsmethoden zu finden. Dies ist jedoch noch nicht gelungen.

Die phänotypischen Tests Wachstum bei 45°C, Chlamydosporenmuster auf Reis-Tween-Agar, Färbung auf CHROMagar und Fluoreszenz auf Methylblau-Agar sind unzuverlässig und können allenfalls in Kombination zu einer Aussage führen (31; 34; 85).

Am verlässlichsten unter den phänotypischen Tests ist die Filamentierung und Chlamydosporenbildung auf Staibagar, die 97% bis 100% richtige Ergebnisse liefert (33; 51).

Standardisierte biochemische Testverfahren, wie das API 20C-System liefern ebenfalls relativ häufig falsche Ergebnisse. Ursache dafür sind einerseits die variablen Kohlenhydrat-assimilationsmuster von *C.dubliniensis* und andererseits noch unzureichende Anpassung der Datenbanken (31; 62).

Genauer scheint hier die Bestimmung der intrazellulären β -Glucosidase-Aktivität zu sein, die bei fast keinem *C.dubliniensis*-Isolat nachweisbar ist (3; 34).

PCR-Verfahren zur Speziesidentifizierung existieren ebenfalls, doch fehlen in den meisten Routinelabors die nötigen technischen Voraussetzungen (33; 48).

Die genetischen Tests wie RFLPs und Sequenzanalysen liefern zwar richtige Ergebnisse (80), sind aber als Routineverfahren in der Diagnostik wesentlich zu aufwendig.

So konnte sich noch keine Methode standardmäßig etablieren, und sicher werden immer noch viele *C.dubliniensis* Isolate fehlklassifiziert.

1.1.3 Epidemiologie und Klinik

Hauptisolationsort von *C.dubliniensis* ist die Mundhöhle HIV-infizierter Patienten.

Hier beherbergen 17% aller HIV-Patienten im Spätstadium *C.dubliniensis* zumindest als Komponente einer Mischkultur (31), bei bereits positivem Hefenachweis erhöht sich dieser Anteil sogar auf 30% (34; 83).

Auch bei Nicht-HIV-Infizierten ist die Mundhöhle die häufigste Infektionslokalisation. Risikofaktoren für eine Erkrankung sind allgemeine Immunsuppression und vorherige Antibiotikatherapie und somit die gleichen wie bei *C.albicans*. In 12,5% der Fälle von Oropharyngealer Candidose (OPC) bei HIV-negativen Patienten ist *C.dubliniensis* nachweisbar (64).

Das klinische Erscheinungsbild entspricht meist dem eines typischen „Soor“, wobei *C.dubliniensis* häufiger mit rekurrenden Infektionen und der erythematösen Form der OPC assoziiert sein soll. Ob sich dies bestätigen wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Ein Nachweis von *C.dubliniensis* ist aber nicht notwendigerweise mit einer klinischen Symptomatik verbunden. Wesentlich häufiger sogar fehlen pathologische Veränderungen in der Mundhöhle. Bei klinischer Symptomatik dominieren Mischinfektionen, meist mit *C.albicans*, aber auch mit nicht-*albicans*-Spezies. Es wurden jedoch auch Fälle von OPC beschrieben, bei denen nur *C.dubliniensis* nachweisbar war und damit auch für die Symptomatik verantwortlich sein muss.

Auch im Oropharynx gesunder Nicht-HIV-Infizierter fanden Coleman und Sullivan zu ca. 3,5% *C.dubliniensis* (64). Somit ist dieser Keim ein potentieller Bestandteil der normalen Mundflora. Warum aber der Anteil der asymptomatischen *C.dubliniensis*-Träger unter den HIV-Patienten soviel höher liegt, bleibt bislang noch ungeklärt.

Außerhalb der Mundhöhle findet man *C.dubliniensis* noch relativ häufig ohne Symptomatik in Stuhlproben, gelegentlich im Respirationstrakt und in manchen Fällen von Candida-Vaginitis (54). Hier scheint keine Assoziation mit einer HIV-Infektion zu bestehen, für endgültige Aussagen sind aber die Fallzahlen noch zu gering.

Tiefe Organmykosen durch *C.dubliniensis* sind bislang nicht bekannt (54), dafür wurde die Isolation von *C.dubliniensis* aus Blutkulturen beschrieben (4; 44). Alle betroffenen Patienten hatten die Entstehung einer Candidämie begünstigende Grunderkrankungen, wie chemotherapeutisch behandelte hämatologische Erkrankungen oder finale Lebererkrankungen und wiesen die Symptomatik einer Sepsis auf. Trotzdem kann dies nicht als Beweis für eine symptomatische *C.dubliniensis*-Candidämie gewertet werden, da in fast allen Fällen noch weitere Pilze oder Bakterien in den Blutkulturen gefunden wurden, oder eine Antibiotikatherapie vorausging (vgl. 4.2.3).

So bleibt festzustellen, dass *C.dubliniensis* vor allem bei HIV-Patienten recht häufig die Mundhöhle kolonisiert, aber nur in wenigen Fällen als alleiniger Auslöser einer klinischen Symptomatik auftritt. Außerhalb von Oropharynx und Respirationstrakt, finden sich neben einigen Fällen von Vaginitis keine Infektionen, die mit Sicherheit auf *C.dubliniensis* zurückzuführen sind.

C.dubliniensis scheint also im Vergleich zu *C.albicans* eine geringere Virulenz zu besitzen, besonders bezüglich einer Infektion der tieferen Organe oder der Blutbahn. Dies entspricht auch den Ergebnissen der bisher durchgeführten Tierversuche, die für eine systemische Infektion im Mausmodell bei *C.dubliniensis* doppelt so lange Überlebenszeiten gefunden haben (24) (vgl. 4.2.3).

1.1.4 Therapie und Resistenzen

Die Angaben zur Antimykotikaempfindlichkeit zu interpretieren ist schwer, da die Zahl der untersuchten Isolate in den einzelnen Studien gering und die Prozentangaben damit nicht repräsentativ sind. Im Großen und Ganzen findet man aber, wenn überhaupt, dann Resistenzen gegen Fluconazol bei voller Sensibilität für Amphotericin B, 5-Fluocytosin, die Echinocandine und meist auch für die anderen Azole. Der Prozentsatz voll fluconazol-empfindlicher Stämme schwankt zwischen 80% und 100% (4; 26; 49; 59; 64; 67).

In vitro läßt sich eine solche Fluconazolresistenz ohne Kreuzresistenzen durch langsam steigende Fluconazolkonzentrationen im Medium hervorrufen. Zugrunde liegt die verstärkte Expression von „Multidrug-Transportern“, die auch bei *C.albicans* vorkommen und für einen aktiven Efflux des Antimykotikums sorgen (50).

In manchen Studien ist auch der durchschnittliche Fluconazol-MIC für *C.dubliniensis* höher als für *C.albicans*, während andere Untersucher zum gegenteiligen Ergebnis kommen (54; 67).

Klinisch scheinen die Fluconazolresistenzen kaum von Bedeutung zu sein, sonst wäre die Rate fluconazolresistenter Isolate nach vorhergehender Fluconazoltherapie, wie bei den meisten HIV-Patienten der Fall, höher und würde auch klinisch in Form von Therapieversagern in Erscheinung treten. Ruhnke konnte zeigen, dass bei einem HIV-Patienten mit Langzeit-Fluconazoltherapie bei nun erhöhter Dosis der schon lange kolonisierende *C.dubliniensis*-Stamm aus den Isolaten verschwand, während der *C.albicans*-Stamm weiter nachweisbar blieb (71).

1.2 Dimorphismus bei *C.albicans*

C.albicans besitzt die Fähigkeit, abhängig von den Milieubedingungen seine Morphologie zu ändern. Bei 30°C auf typischen Hefenährmedien wie YPD oder YNB wächst er als Sprosspilz, kann aber als Reaktion auf Temperatur- und pH-Anstieg sowie Zugabe bestimmter Induktoren wie Serum oder N-Acetylglucosamin in echtes myzeliales Wachstum übergehen (6).

Dieser Morphologiewechsel spielt bei *C.albicans* eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor. So scheint die filamentöse Form für die Schädigung und das Durchdringen von Epi- und Endothelbarrieren sowie für die Zerstörung von Organparenchym notwendig zu sein (38; 61; 87). Für Endothelzellen konnte Phan (61) in seiner Arbeit diesen Zusammenhang

nachweisen. Mutanten mit defekter Keimschlauchbildung zeigten in parallelem Ausmaß verminderte Endothelzellinvasion und -zerstörung (61). Auch zur Evasion aus Makrophagen ist Hyphenbildung notwendig. Wie wichtig diese Fähigkeit für den Infektionsablauf ist, zeigt die Feststellung von Lo, dass homozygote *cph1-efg1*-Doppelnullmutanten, die unter den Standardbedingungen *in vitro* keine Keimschlauchbildung mehr zeigen, im Mausmodell praktisch avirulent sind (38). Doch auch der Sprosszellenform wird in bestimmten Phasen der Erkrankung ihre Bedeutung zukommen, möglicherweise als Transportform im Blut oder zur effizienten Vermehrung.

1.2.1 pH-induzierter Dimorphismus

1.2.1.1 Rim101 und die Rim-Kaskade

Unter den vielen Bedingungen, die bei *C.albicans* Filamentierung hervorrufen, ist der Mechanismus, der zur pH-abhängigen Filamentierung führt, mit am genauesten entschlüsselt. Er umfasst eine Signaltransduktionskaskade, die nach ähnlichem Prinzip auch in *A.nidulans*, *A.niger*, *P.chrysogenum*, *Y.lipolytica* und *S.cerevisiae* vorkommt (12; 35; 37; 40).

Zentraler Bestandteil dieses Signalübertragungsweges ist der Transkriptionsfaktor Rim101, der, wie auch Rim101 von *S.cerevisiae* und *Y.lipolytica* sowie PacC von *A.nidulans* und *A.niger* zur großen Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren gehört (12; 35; 37; 40).

Ein Zinkfinger umfasst einen Proteinabschnitt von circa 30 Aminosäuren, von denen zwei Cystein- und zwei Histidinreste an vorgegebenen Stellen von essentieller Bedeutung sind, da sie in tetraedrischer Anordnung eine koordinative Bindung mit dem zentralen Zinkion eingehen und damit Form und Stabilität des Zinkfingers gewährleisten (79). In Abb. 1.2 ist ein solcher Zinkfinger schematisch dargestellt.

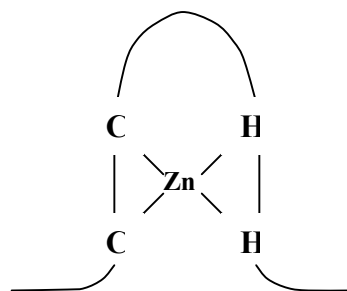


Abb. 1.2 Schematische Darstellung eines Zinkfingers modifiziert nach Stryer (79)

Die spezifische DNA-Erkennung erfolgt durch die Bindung bestimmter Aminosäuren in der zweiten Hälfte des Zinkfingers an Basen der entsprechenden DNA-Sequenz. Jeder Zinkfinger bindet in Abhängigkeit von diesen drei Aminosäuren an ein bestimmtes Basentriplett. Durch das Zusammenwirken mehrerer Zinkfinger können auch längere DNA-Sequenzen spezifisch erkannt und gebunden werden (79).

Drei dieser Zinkfinger sind in *C.albicans*-Rim101 zwischen Aminosäure 208 und 300 zu einer Domäne angeordnet (68). Vor allem der zweite, aber auch der dritte sind mit einer Identität von 87% beziehungsweise 67% zu PacC von *A.nidulans* stark konserviert und vermitteln die DNA-Bindung. Der erste Zinkfinger weicht mit nur 53% Identität deutlicher von PacC und von der Konsensussequenz ab. Er bindet wohl nicht an die DNA, sondern dient, wie für *A.nidulans* schon bewiesen, der räumlichen Stabilisierung des Moleküls (19). Im Gegensatz zu diesem, schon aus funktionellen Gründen hochkonservierten Bereich, bestehen über das gesamte Molekül nur 20% Identität mit Rim101 von *S.cerevisiae*.

Neben seiner zentralen Rolle bei der Vermittlung der pH-induzierten Filamentierung ist Rim101 verantwortlich für die Anpassung der Genexpression an einen alkalischen pH-Wert der Umgebung. Dazu induziert Rim101 Gene, die im alkalischen Milieu benötigt werden und reprimiert im Gegenzug Gene, die rein für saure Umweltbedingungen konzipiert sind (9; 17; 66; 68). In Abb. 1.3 ist das schematisch dargestellt.

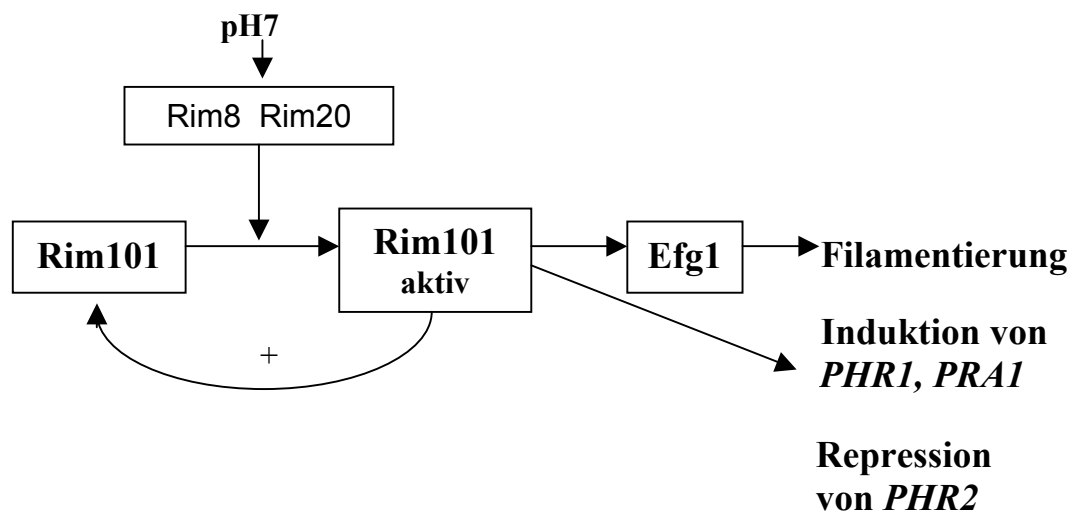


Abb. 1.3 pH-Signaltransduktionskaskade bei *C.albicans*

Rim101 wird in einer inaktiven Form gebildet und erst bei alkalischem pH aktiviert. Verantwortlich dafür ist die sogenannte Rim-Kaskade um die Faktoren Rim8 und Rim20, die im alkalischen Milieu die proteolytische Aktivierung von Rim101 vermittelt (9; 17; 68). Der genaue Ablauf des Aktivierungsprozesses ist für *C.albicans* noch nicht untersucht, doch

spricht einiges dafür, dass er dem gleichen Prinzip folgt, wie in Abschnitt 1.2.1.2 für PacC von *A.nidulans* beschrieben.

Das aktivierte Rim101 verstärkt nun über eine positive Rückkoppelung seine eigene Expression auf das 3 - 5-fache und ist damit selbst ein alkalisch induziertes Gen (66; 68). Weitere Gene, die unter dem Einfluss von Rim101 exprimiert werden, sind die der beiden Zellwandproteine *PRA1* und das für normales Zellwachstum in alkalischem Milieu essentielle *PHR1*. *PHR2*, das im sauren Milieu exprimierte Pendant zu *PHR1* wird reprimiert (17; 52).

Für die Filamentierungsinduktion über diese Kaskade ist ein weiterer Transkriptionsfaktor Efg1, stromabwärts von Rim101 erforderlich (17).

1.2.1.2 Rim101-Aktivierung

Der Aktivierungsmechanismus ist für *C.albicans*-Rim101 noch nicht genauer untersucht, aber für *S.cerevisiae* und vor allem *A.nidulans* liegen detailliertere Informationen vor. Die Ähnlichkeit der Mechanismen bei diesen beiden doch recht unterschiedlichen Spezies, der prinzipiell gleiche Aufbau von *C.albicans*-Rim101 und die Existenz von konstitutiv aktiven Mutanten auch bei *C.albicans* (vgl. 1.2.1.3) sprechen dafür, dass das Aktivierungsprinzip auch in dieser Spezies konserviert ist.

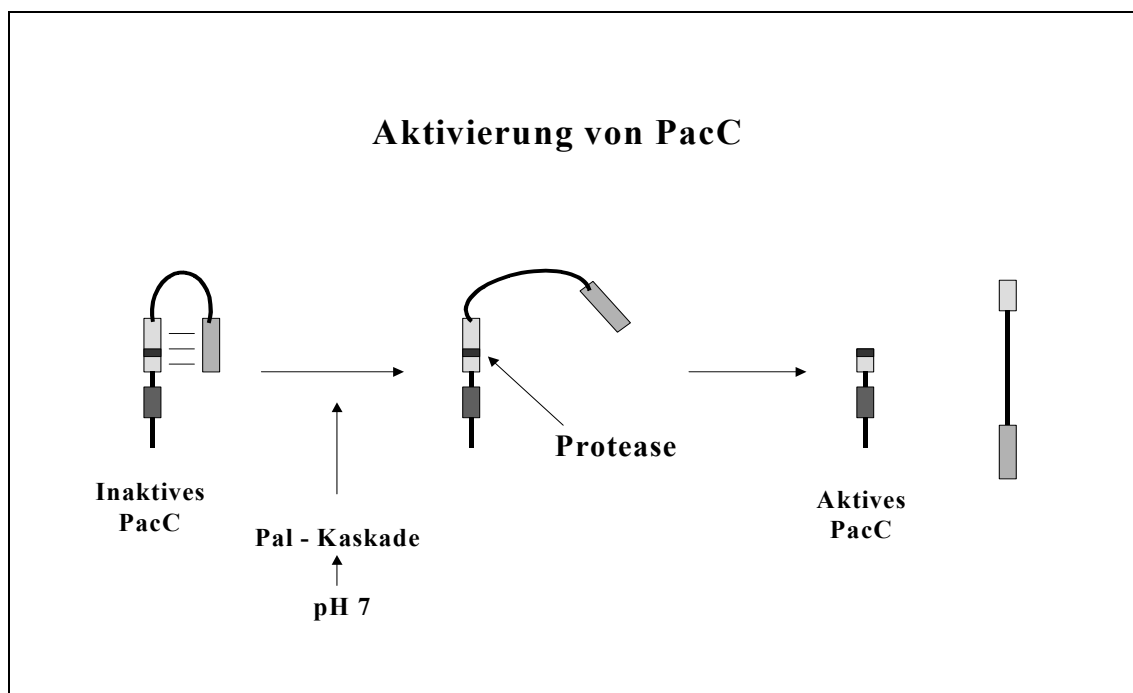


Abb.1.4 Die pH-induzierte Aktivierung von *A.nidulans*-PacC

Das primäre Translationsprodukt von *A.nidulans*-PACC besteht aus 678, bzw. nach neuen Erkenntnissen aus 674 Aminosäuren und ist funktionell inaktiv (45). Die für die DNA-Bindung zuständige Zinkfingerdomäne befindet sich zwischen den Positionen 76 und 165. Direkt C-terminal von diesem Bereich gibt es zwei Domänen, Aminosäuren 169 - 301 und 334 - 410, die intramolekulare Brücken mit der C-terminalen Region zwischen Aminosäure 529 und 678 ausbilden. Dadurch halten sie das Molekül in einer geschlossenen, für die Proteolyse unzugänglichen Form (20). Bei alkalischem pH wird nun zunächst die Pal-Kaskade aktiviert, die aus sechs bekannten Faktoren besteht. Darunter befinden sich mit PalI und PalH zwei Transmembranproteine, PalH mit Ähnlichkeit zu G-Proteingekoppelten Rezeptoren (12; 53) und die Calpain-ähnliche Cysteinprotease PalB (11; 53). Vermittelt durch diese Kaskade kommt es zu einer Konformationsänderung, die das Molekül in eine offene Form überführt, so sein Eindringen in den Zellkern ermöglicht und es zudem für die aktivierende Protease zugänglich macht. Das Zellkern-Lokalisationssignal befindet sich dabei im Bereich der Zinkfinger-Region, ist aber nicht von einer Bindung an die DNA abhängig (46).

Der Bereich zwischen Aminosäure 465 und 540 scheint für die Übertragung des Pal-Signals auf PacC oder dessen Primärantwort essentiell zu sein, da die Deletion dieses Abschnitts PacC auch bei alkalischem pH in der nicht aktivierbaren Form hält (45).

Möglicherweise entfernt die Calpain-artige Serinprotease PalB ein kurzes C-terminales Stück von PacC und führt somit über eine Schwächung der intramolekularen Brücken zu der oben genannten Konformationsänderung (11; 12).

Die endgültige Proteolyse wird durch eine konstitutiv aktive Protease katalysiert, die eine Sequenz oberhalb von Aminosäure 235 erkennt und zu einer sequenzunabhängigen Spaltung zwischen Position 252 und 258 führt (45). Ob diese Proteolyse nach Transfer der offenen PacC-Form in den Zellkern dort stattfindet oder aber noch im Zytoplasma, ist noch nicht endgültig geklärt (46).

Bei *S.cerevisiae* ist der prinzipielle Ablauf gleich, nur ist der abgespaltene Abschnitt mit 70 Aminosäuren deutlich kürzer (37).

1.2.1.3 Konstitutiv aktives Rim101

Bei allen bislang bekannten Rim101-Homologen gibt es Mutationen, die zu einer pH-unabhängigen Aktivierung und damit zur Ausprägung eines „alkalischen Phänotyps“ auch bei saurem pH führen (12; 17; 35; 37; 40; 57; 84). Zugrunde liegt allen eine Punkt- oder Frameshiftmutation, die zu einem vorzeitigen Stopcodon im carboxyterminalen Bereich

des Moleküls führt. Bei der Translation entsteht somit ein Protein, dem der für die Ausbildung der intramolekularen Brücken notwendige Bereich am Carboxyende fehlt. Als Konsequenz davon liegt das Molekül schon primär in einer offenen Form vor und wird somit pH-unabhängig prozessiert. Es kommt also bei diesen Mutanten auch im sauren pH-Bereich zur Expression der Rim-induzierten Gene und somit zur Ausprägung des „alkalischen Phänotyps“.

1.2.1.4 *RIM101*-Nullmutanten

Obwohl das im alkalischen Milieu für normales Zellwachstum essentielle *PHR1*-Gen in *rim101*-Nullmutanten nicht exprimiert wird, zeigen diese auch bei alkalischem pH keinen Wachstumsdefekt, da *PHR2* nun nicht mehr reprimiert wird und damit das Fehlen von Phr1 kompensieren kann (68).

Bezüglich der Filamentierung finden sich mediaabhängig unterschiedliche Defekte. In Flüssigkulturen ist die Keimschlauchbildung nur in M199 pH7,5 beeinträchtigt. Bei Festkulturen fehlt sowohl auf M199 als auch auf 10% Serum die Keimschlauchbildung, während auf Spider-Medium und Lee-Medium die Hyphenbildung zwar stark verringert, aber immer noch deutlich erkennbar ist (68).

Dieser Filamentierungsdefekt ist möglicherweise mitverantwortlich für die Virulenzabschwächung von *rim101*-Deletionsmutanten im hämatogen disseminierten Mausmodell (10). Während mit heterozygoten Mutanten die gleiche mittlere Überlebenszeit erreicht wird wie mit dem Wildtyp, ist diese bei Infektion mit der homozygoten *rim101*-Nullmutanten auf mehr als das Dreifache verlängert. Das spiegelt sich auch in den Koloniezahlen und den histologischen Veränderungen der Niere wider. 20 Stunden post infectionem sind die Koloniezahlen bei Wildtyp und Deletionsmutante noch identisch, nach 40 Stunden zeigt sich bei letzterer aber eine Abnahme der Keimzahl gegenüber deutlicher Zunahme beim Wildtyp. Daraus ist zu schließen, dass nach intravenöser Verabreichung Rim101 für die Kolonisation der Niere nicht nötig ist, sehr wohl aber für die Aufrechterhaltung der Infektion. Bei histologischen Untersuchungen findet man die Nullmutante fast ausschließlich in der Hefeform mit nur minimaler umgebender Immunreaktion. Der Wildtyp hingegen bildet Hyphen und provoziert eine starke Immunantwort, die zur Ausbildung disseminierter Mikroabszesse in der ganzen Niere führt (10).

1.2.2 CO₂-induzierte Filamentierung

In den 70er und vor allem 80er Jahren war der Einfluss von CO₂ auf die Morphologie von *C. albicans* ein recht häufig untersuchtes Thema, das aber im Laufe der 90er Jahre aus den Forschungsinhalten verschwand, ohne je endgültig geklärt worden zu sein.

Sicher jedoch ist, dass ein CO₂-Anstieg bei *C. albicans* auf bestimmten Medien mit beispielsweise Serum, Asparagin, Glycin oder Ornithin als Stickstoffquelle (41; 75) sowie auf reinem Agar (47) den Übergang in eine filamentöse Wachstumsform auslösen kann. Auf Medien mit Ammoniumchlorid, L-Prolin oder L-Tryptophan als Stickstoffquelle hingegen ist durch CO₂-Erhöhung kein myzeliales Wachstum induzierbar (41; 75).

Neben dem Kulturmedium haben auch Temperatur und pH-Wert einen Einfluss auf die CO₂-induzierte Filamentierung. So findet man bei 37°C auf entsprechenden Medien schon bei atmosphärischem CO₂ hauptsächliches Hyphenwachstum, während bei 30°C erst die Erhöhung des CO₂-Gehaltes zu deutlich sichtbarem myzelialem Wachstum führt (70).

Bezüglich der optimalen CO₂-Konzentration wurden ebenfalls Versuche durchgeführt. 1969 stellte Mardon fest, dass maximale Filamentierung bei einem CO₂ zu O₂-Verhältnis von 2:1 erreicht wird (41). Weitere Erhöhung des CO₂-Anteils führte zu genereller Wachstumshemmung. Diese Ergebnisse wurden allerdings mit einer *C. albicans*-Variante gewonnen, die ein atypisches Filamentierungsverhalten zeigt und unter induktiven Bedingungen Pseudohyphen, nicht aber Keimschläuche bildete. Sims und Mock arbeiteten beide mit einem CO₂-Gehalt von 10%, um optimale Ergebnisse zu erzielen (47; 75). Ab 20% CO₂ zeigte sich wiederum eine Wachstumsinhibierung.

1.3 Chlamydosporen

Nach der Definition von Odds handelt es sich bei Chlamydosporen um große, dickwandige, lichtbrechende Zellen, die, ausgehend von speziellen Trägerzellen an der Spitze von Hyphen und Pseudohyphen entstehen (7). Innerhalb der Gattung *Candida* werden sie nur von *C. albicans* und *C. dubliniensis* gebildet (76). Welche Funktion dieser Zellform zukommt, ist noch unklar. Möglicherweise handelt es sich um ruhende Zellen, die aber nur eine kurze Lebensfähigkeit haben und auch nur in den ersten Tagen nach ihrer Entstehung sprossen können (69).

Chlamydosporenbildung lässt sich durch bestimmte Umweltbedingungen induzieren. Besonders reichlich erscheint sie auf Medien, die Detergenzien wie Tween 80 enthalten und bei 25°C bis 30°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert werden. Licht und Glucose wirken inhibierend (48; 86).

Auf molekularer Ebene ist bisher nur die essentielle Bedeutung von Efg1 für die Chlamydosporenbildung bekannt, wohingegen Cph1- und Tpk1-Deletionsmutanten die Chlamydosporenbildung nicht beeinflussen (76).

In vivo wurden Chlamydosporen bislang kaum gefunden. Nur Cole beschrieb 1991 chlamydosporenartige Zellen in der Magenmukosa und -submukosa infizierter immunsupprimierter Mäuse. Auch *in vitro* konnte er durch Zugabe von Cyclophosphamid die Chlamydosporenbildung steigern (7).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschränke	KB 500: Heraeus, Hanau
Cleanbanch	BSB 4A: Gelaire Flow Laboratories
Diffusions-Entfärbeapparatur	Desaga, Sarstedt-Gruppe
Gasbrenner	GASl: Schütt
Gefrierschrank	Liebherr
Elektrophoresekammern	DNA Subcell: BioRad, München
Elektroporationsgerät	Gene Pulser: BioRad, München
Feinwaagen	R 160 P, PT 120: Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentationssystem	MidiDoc: Herolab, Wiesloch
Hybridisierungsöfen	Hybaid: Biometra, Göttingen
Kleine Analysenwaage	Sartorius portable: Sartorius, Göttingen
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge	Mikro Rapid/ K: Hettich, Tuttlingen RC-5B, Sorvall: Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizung	M 35 GLW
Mikrowelle	MWS 1820 Duo: Bauknecht
Mikroskope	Aristoplan und DMRB: Leica, Bensheim Dialux 22 HY-100/8: Leitz, Wetzlar
Mikroskop-Photoaufsatz	Orthomat 8528: Leitz, Weimar
Pipetten	Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl 2 - 20 µl 10 - 100 µl 50 - 200 µl 100 - 1000 µl
Sequenzierapparat	ABI Prism Sequencer 377: Perkin Elmer, Weiterstadt
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply E431: Consort, Turnhout, Belgien Power Supply 200/2.0: BioRad, München
Speed Vac Plus	SC110A: Savant, New York

Spektralphotometer	U-2000: Hitachi, San Jose, CA, USA
Szintillationszähler	Tri-Carb 2100 TR: Canbarra-Packard, Dreieich
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld
Thermocycler	T3: Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	EBA 12: Hettich, Tuttlingen
Vortexer	REAX 2000: Heidolph, Kelheim
Schüttelinkubator	G24 Environmental Incubator Shaker: New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, N. J., USA
Schüttelwasserbad	Gyrotroy Water Bath Shaker Model G 67: New Brunswick Sientific Co. Inc. Edison, N. J., USA
UV-Stratalinker 1800	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugen	EBA 12/12R, Mikro Rapid/K: Hettich, Tuttlingen Biofuge Pico: Heraeus, Hanau Omnifuge 2.0 RS: Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bottle-Top-Filter	Hartenstein, Würzburg
Deckgläser	Hartenstein, Würzburg
Elektroporationsküvetten, 0,2 cm	Eurogentec, Seraing, Belgien
Falcon-Röhrchen 10 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Hartenstein, Würzburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße RNase-frei, 1,5 ml	Ambion, Austin, USA
Röntgenfilm Hyperfilm TM-MP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugengefäße 15 ml und 50 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

Chemikalien: Amersham Pharmacia (Freiburg)
AppliChem (Darmstadt)
Eurogentec (Seraing, Belgien)
ICN Biomedicals (Asse-Relegem, Belgien)
Merck (Darmstadt)
Roth (Karlsruhe)
Serva (Heidelberg)
Sigma (München)
Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande)

Medien: Becton Dickinson (Heidelberg)
Difco Laboratories (Augsburg)
Gibco (Paisley, Schottland)
Life Technologies (Karlsruhe)

Reaktionskits: Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Qiagen (Hilden)
Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande)

Enzyme: New England Biolabs (Schwalbach)

2.2 Stämme

2.2.1 Bakterien

In dieser Arbeit wurden Bakterien, auf Grund ihrer kürzeren Generationszeit zur schnelleren Vervielfältigung von *Candida*-DNA-Abschnitten verwendet. Je nach Verfahren wurden folgende E. coli-Stämme benutzt:

XL1-Blue MRF (Stratagene)

$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrBC-hsdSMR-mrr)$ 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F'
proAB lacI^q ZΔM15 Tn5(Kan^R)]

zur Elektroporation

DH5 α (Hanahan, 1983)

F⁻ *endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁻) *supE44 thi-1 λ ⁻ recA1 gyrA relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR ϕ 80d/lacZ Δ M15*

als calciumkompetente Zellen

TOP10 Cells (Invitrogen)

F⁻ *mcrA endA1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80d/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR arabD139 Δ (ara-leu)7697 galU galk rpsL (Str^R) endA1 nupG*

zur TOPO-Klonierung

2.2.2 Candida-Stämme**2.2.2.1 Candida albicans-Stämme**

Stamm	Genetische Eigenschaften	Mutterstamm	Referenz
SC 5314	Wildtyp		Gillum et al., 1984
CAF 3-1	<i>ura3Δ</i>		Fonzi and Irwin 1993
CAR 2	<i>rim101Δ</i>		
CAR 26	<i>rim101Δ ura3Δ</i>		
CMW 5/	(pBSK+- <i>Cd-RIM101</i> (HD-03)- <i>URA3</i>)	CAR 26	diese Arbeit
CMW 79/	<i>Ca-rim101Δ/ Ca-rim101Δ</i> (pBSK+- <i>Cd-RIM101</i> (CBS 7987)- <i>URA3</i>)	CAR 26	diese Arbeit
CEM 1	<i>Ca-rim101Δ/ Ca-rim101Δ</i> <i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ ura3Δ</i>	CFM-4	El Barkani 2000
CEM 8	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) _{n>2} <i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ</i>		El Barkani 2000
CEM 10	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) <i>RIM101-1426/rim101Δ phr2Δ</i>		El Barkani 2000
CAF 3-16-1	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) <i>RIM101/RIM101</i>		El Barkani 2000
CAF 3-31-1	(pBSK+- <i>RIM101-URA3</i>) <i>RIM101/RIM101</i>		El Barkani 2000

CMW 1-77	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) n>2 <i>RIM101/RIM101</i>	CAF3-1	diese Arbeit
CMW 1-85	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) n>2 <i>RIM101/RIM101</i>	CAF3-1	diese Arbeit
CMW 1-93	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) n>2 <i>RIM101/RIM101</i>	CAF3-1	diese Arbeit
CMW 1-200	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) n>2 <i>RIM101/RIM101</i>	CAF3-1	diese Arbeit
CMW 1-30	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) 0<n≤2 <i>RIM101/RIM101</i>	CAF3-1	diese Arbeit
CMW 1-31	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) 0<n≤2 <i>RIM101/RIM101</i>	CAF3-1	diese Arbeit
CMW 2-182	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) n>2 <i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ</i>	CEM 1	diese Arbeit
CMW 2-10	(pBSK+- <i>RIM101-1426-URA3</i>) n>2 <i>RIM101-1426/RIM101 phr2Δ</i>	CEM 1	diese Arbeit
JKC 18	<i>cph1Δ ura3Δ</i>		Liu et al., 1994
JKC 18-pSM2	<i>cph1Δ</i> (pBSK+ - <i>URA3</i>)		El Barkani 2000
HLC 67	<i>efg1Δ ura3Δ</i>		Lo et al., 1997
HLC 67-pSM2	<i>efg1Δ</i> (pBSK+ - <i>URA3</i>)		El Barkani 2000
CDB 1	<i>cph1Δ efg1Δ ura3Δ</i>		Bockmühl, Lo et al., 1997
CDB 1-pSM2	<i>cph1Δ efg1Δ</i> (pBSK+ - <i>URA3</i>)		El Barkani 2000

2.2.2.2 *Candida dubliniensis*-Stämme

CBS 7987 Referenzstamm

2.2.2.3 *Candida*-Patientenisolate

In der Spalte „Spezies“ bedeutet ca jeweils *C.albicans*, cd *C.dubliniensis*, sc *S.cerevisiae* und ct *C.tropicalis*. In der Spalte „Patient“ ist die Grunderkrankung des Patienten aufgeführt, wobei TX einen Zustand nach Organtransplantation bezeichnet.

Hannover-Stämme

Nr.	Isolat-Nr.	Isolat	Candida-Spezies	Studien-Nr.	Patientengruppe
1	88326	II	ca	HA-01	HIV
2	85733	I	cd	HD-01	HIV
3	85733	II	sc		
4	85734	I	cd	HD-02	HIV
5	83753	I	cd	HD-03	HIV
6	83753	II	ct		
7	90353		ca	HA-02	HIV
8	92682		ca	HA-03	HIV
9	93155	II	ca	HA-04	HIV
10	96287		ca	HA-05	HIV
11	96569	I	ca	HA-06	HIV
12	96569	II	ca	HA-07	HIV
13	98750		ca	HA-08	HIV
14	98770		ca	HA-09	HIV
15	99074		ca	HA-10	HIV
16	99235	II	ca	HA-11	HIV
17	99468	II	ca	HA-12	HIV
18	100307	I	ca	HA-13	HIV
19	100307	II	cd	HD-04	HIV
20	100431		ca	Ha-14	HIV
21	100432	II	ca	HA-15	HIV
22	100435	I	ca	HA-16	HIV
23	100435	II	ca	HA-17	HIV
24	100660	I	cd	HD-05	HIV
25	100660	II	cd	HD-06	HIV
26	100661	I	ca	Ha-18	HIV
27	100803		ca	HA-19	HIV
28	101031		ca	HA-20	HIV
29	101163		cd	HD-07	HIV
30	101343		ca	HA-21	HIV
31A	101344		ca	HA-22	HIV
31B	101353		ca	HA-23	HIV
32	101354		ca	HA-24	HIV
33	101355		ca	HA-25	HIV
34	100791		ca	HA-26	HIV
35	7109	II	cd	HD-08	HIV
36	101622	II	ct		HIV
37	102020		ca	HA-27	HIV
38	102021		ca	HA-28	HIV

39	102241	I	ca	HA-29	HIV
40	102569		ca	HA-30	HIV
41	104795	I	cd	HD-08	HIV
42	104796		ca	Ha-31	HIV
43	105045		cd	HD-10	HIV
44	106003		cd	HD-11	HIV
45	109659		cd	HD-12	HIV
46	109932		cd	HD-13	HIV
47	110049		ca	HA-32	HIV
48	111372		cg & cd		
49	111374		cd	HD-14	HIV
50	111629		cd	HD-15	HIV
51	109061		cd	HD-16	HIV
52	109514		cd	HD-17	HIV
54	117758		cd	HD-18	HIV
55	118555		ca	HA-33	HIV
56	120367		ca	HA-34	HIV
57	120789	II	cd	HD-19	HIV
58	121398		ca	HA-35	HIV
59	121509		ca	HA-36	HIV
60	123000		ca	HA-37	HIV
61	123531		ca	HA-38	HIV
62	125130	I	cd	HD-20	HIV
63	125965		ca	HA-39	TX
64	126577	I	ca	HA-40	TX
65	126591		ca	HA-41	HIV
66	126683		ca	HA-42	TX
67	126787	I	ca	HA-43	TX
68	126788	II	ca	HA-44	TX
69	126787	II	ca	HA-45	TX
70	126788	I	ca	HA-46	TX
71	126826	I	ca	HA-47	HIV
72	127145		ca	HA-48	TX
73	127285		ca	HA-49	TX
74	127287		ca	HA-50	TX
75	127432		ca	HA-51	TX
76	127617		ca	HA-52	TX
77	127779		cd	HD-21	HIV
78	128083		ca	HA-53	TX
79	128084	I	ca	HA-54	TX
80	128120		ca	HA-55	TX
81	128146		ca	HA-56	TX

82	128461		ca	HA-57	TX
83	128466		ca	HA-58	TX
84	128467		ca	HA-59	TX
85	128773		ca	HA-60	TX
86	129138		ca	HA-61	TX
87	129158		<u>ct</u>		
88	129436		ca	HA-62	TX
89	129949		ca	HA-63	TX
90	130147		ca	HA-64	TX
91	130227		ca	HA-65	TX
92	130391		ca	HA-66	TX
93	130797		ca	HA-67	TX
94	130920		ca	HA-68	TX
95	131132		ca	HA-69	HIV
96	131636		ca	HA-70	HIV
97	131788		ca	HA-71	TX
98	131803		ca	HA-72	HIV
99	131921		ca	HA-73	TX
100	132016		ca	HA-74	HIV
101	132017		ca	HA-75	HIV
102	132018		ca	HA-76	HIV
103	132448		ca	HA-77	HIV
104	132909		ca	HA-78	TX
105	133451		ca	HA-79	
106	133637		ca	HA-80	HIV
107	133791		ca	HA-81	TX
108	134250		ca	HA-82	<i>TX</i>
109	134614		ca	HA-83	HIV

Stämme aus einer unveröffentlichten Studie von Dr. W. Heinz aus Würzburg

	interne Nr.	Spezies
110	212	ca
111	370	cd
112	294	cd
113	111	cd
114	296	cd
115	298	cd
116	361	cd

117	284	cd
118	367	cd
119	272	cd
120	277	ca
121	411	cd

Patienten-Isolate aus CF-Studie (Würzburg)

fortlaufende Nr.	Isolat-Nr.	interne Nr.	Spezies	Material	Patientengruppe
122	870199	M 104/2	cd	Sputum	CF
123	862290	566/1	cd	Rachenabstrich	CF
124	862287	592/3	cd	Rachenabstrich	CF
125	805978	696/6	cd	Sputum	CF
126	854735	512	cd	Sputum	V.a. Tbc
127	875503	18777	cd	Sputum	HIV
128	862281	392/6	cd	Sputum	CF
129	870241		cd	Sputum	CF
130	869681	3583	cd	Sputum	V.a. Tbc
131	861308		cd	Rachenabstrich	ORSA
132		814 dg	cd	Stuhl	
133		A 308 C.d.	cd		
134		Cd 4363100	cd		
135		Sp 5892	ca		

2.3 Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Plasmide

Bezeichnung	Ausgangsplasmid	Insert	Referenz
pSM2	pBSK(+)	<i>URA3</i>	El Barkani 2000
pMW1/5	pSM2	<i>Cd-RIM101(Hd-03)-2,5kb</i>	diese Arbeit
pMW1/79	pSM2	<i>Cd-RIM101(CBS 7987)-2,5kb</i>	diese Arbeit
pEM16-1	pSM2	<i>RIM101-1426</i>	El Barkani 2000

2.3.2 Oligonukleotide

Primer zur Clonierung von *Cd-RIM101*

Bezeichnung	Basensequenz	Annealingtemperatur
Cd-PRR2-1	TTA GAA AGC AGT TAT AGT TGG	56°C
Cd-PRR2-2	GGA TGT GAA CAT GTC CGC	56°C
Cd-PRR2-3	GAT TTG GAA ACT TGA GAG TAG	58°C
Cd-PRR2-4	GAA CCA TGT AAA TAG AGA ACG G	62°C
Cd-PRR2-5	GTG TGT GTA CTC ACT CAC	54°C
Cd-PRR2-7	GTG TGC TCC CAC AGC CTC	60°C
Cd-PRR2-8	ATC GGT ATA ATT GCT TAG	48°C
Cd-PRR2-9	AAA TCG GTA TAA TTG CTT	46°C
Cd-PRR2-10	TAA AAT CGG TAT AAT TGC	46°C
Cd-PRR2-11	AAA GTA AAA TCG GTA TAA	44°C
Cd-PRR2-12	AGT AAA ATC GGT ATA ATT	44°C
Cd-PRR2-13	AAA AAG TAA AAT CGG TAT	44°C
Cd-PRR2-14	TAA AAA AGT AAA ATC GGT	44°C
Cd-PRR2-15	TTG AAA ACC ACC ATC AAC	50°C
Cd-PRR2-16	CAC ACT AAA ATC AAA CAT	46°C
Cd-PRR2-17	TTA GAA AGC AGT TAT AGT TG	52°C
Cd-PRR2-18	CTA ATA ATA TAT TTT TTT TC	44°C
Cd-PRR2-21	CCA CCT TAA CAA TAC CAC T	54°C

Primer zur Sequenzierung von *Cd-RIM101* (7987)

RIM-Cd 1	ACG CTA AAC AAC ATT TGG	50°C
RIM-Cd 1r	TGC ATG TCG ATG GGA ATT	52°C
RIM-Cd 2	GAT TTA AAG AAA CAT TCC AAG	54°C
RIM-Cd 2r	CTC TGT GCC TTC TTC AAC	54°C
RIM-Cd 3	CAA CTA TTG GCA ATG GCT C	56°C
RIM-Cd 3r	GTT GGC CTA CAC TAG GAG	56°C
RIM-Cd 4	CCA ACT ATA ACT GCT TTC TAA	56°C
RIM-Cd 4r	GTG TTG CAC HAC CTT ATA G	56°C
RIM-Cd 5	CCT CAT CTG ATA TTG ATG TAG	58°C
RIM-Cd 6	CCA CAG TCA AGA GAG ATC AT	58°C
RIM-Cd 7	AAC CCT GGT GTT GCC TCT T	58°C

Primer zur Sondenamplifikation

ACT1-1	TGT TTT CCC ATC CCT CGT
ACT1-2	TTC GTC GTA TTC TTG TTT

2.4 Anzucht und phänotypische Methoden

2.4.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium flüssig

1% Bacto-Trypton

0,5% Yeast Extract

1% NaCl

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% Agar

Zur Selektion der gewünschten Stämme kann sowohl flüssiges, als auch festes LB-Medium mit einem Antibiotikum supplementiert werden, gegen das der entsprechende Stamm resistent ist. Da die von uns verwendeten Plasmide alle ein Ampicillin-Resistenzgen enthalten, waren alle E.coli-Stämme nach erfolgreicher Plasmidaufnahme ampicillinresistent. Selektivmedien wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugefügt.

Die Anzucht erfolgt bei 37°C, bei Flüssigkulturen unter permanentem Schütteln zur besseren Durchmischung der Kultur.

2.4.2 Anzucht von Hefen

Zur schnellen, möglichst dichten Anzucht von Hefen empfiehlt sich die Verwendung eines Vollmediums wie YPD, das flüssig oder als Agar mit verschiedenen pH-Werten hergestellt werden kann:

YPD-Medium ohne pH

2% Glucose

2% Pepton

1% Yeast Extract

Diese Zubereitung hat einen pH-Wert von 6,0

YPD-Medium mit speziellem pH-Wert

Zubereitung erfolgt wie oben, mit 150 mM Hepes.

Da Hepes nicht autoklavierbar ist, werden Hepes und Glucose in $\frac{3}{4}$ des Gesamtvolumens gelöst, der pH-Wert eingestellt und sterilfiltriert.

YPD-Agar

Die Zusammensetzung gleicht dem Flüssigmedium, mit 1,5% Agar.

Inkubation erfolgt gewöhnlich bei 30°C, bei Flüssigkulturen unter Schütteln.

Als Vollmedium ermöglicht YPD auch Hefen mit Auxotrophien ein gutes Wachstum. Möchte man gewonnene Prototrophien als Selektionsmerkmal einsetzen, benötigt man dazu ein Mangelmedium wie YNB, das nur komplett prototrophen Stämmen das Wachstum gestattet.

YNB-Medium

2% Glucose

0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,17% YNB (Yeast nitrogen base, Becton Dickinson, Heidelberg)

YNB darf nicht autoklaviert werden und wird darum in 1/10 des Volumens gelöst und sterilfiltriert. Alle anderen Komponenten sind autoklavierbar.

Zur pH-Wert-Einstellung wird der Ansatz mit 150 mM Hepes gepuffert, wie für YPD beschrieben.

Je nach Bedarf kann YNB mit bestimmten Aminosäuren oder Nucleinsäurebasen supplementiert werden, um auch Hefen mit entsprechenden Auxotrophien das Wachstum zu ermöglichen.

2.4.3 Filamentierungsverhalten in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur: Medium 199

Zusammensetzung: 9,8 g M199 (Life Technologies)
 (pro Liter) 35,7 g HEPES (entspricht 150 mM)

Flüssigassays wurden wie folgt durchgeführt :

Zum Nachweis der Funktion von *Cd-RIM101* in *C.albicans* wurde jeweils eine Einzelkolonie der Transformanten über Nacht in M199 pH7 bei 30°C angezüchtet und am nächsten Tag wurden 6×10^7 Zellen dieser Übernachtskultur in 10 ml auf 37°C vorgewärm-tes M199 pH7 überimpft. Nach 2 h und 4 h Inkubation unter kräftigem Schütteln im Wasserbad wurde jeweils eine Probe von 8 µl entnommen und unter dem Mikroskop bei 10- und 40-facher Vergrößerung auf Keimschlauchbildung und Filamentierung untersucht.

Zur Untersuchung der Transformanten mit konstitutiv aktiven *RIM101*-Allelen wurden Einzelkolonien in M199 pH4 angeimpft und unter Schütteln bei 30°C bebrütet. Da Transformanten mit multiplen Kopien schon bei dieser Temperatur Keimschläuche bilden, konnten wir die Kulturen schon nach 2 h - 5 h mikroskopisch beurteilen. Mit Transformanten, die nach 5 h noch keine Keimschlauchbildung zeigten, führten wir einen klassischen Filamentierungsassay durch. 6×10^7 Zellen einer Übernachtskultur in M199 pH4 bei 30°C wurden in 10 ml 37°C warmes M199 pH4 überimpft und wie oben beschrieben weiter behandelt.

Zum „Spotten“ der *C.albicans*-Transformanten mit *Cd-RIM101* auf M199-Platten wurden aus den Übernachtskulturen 2×10^7 Zellen abgenommen, abzentrifugiert und in 100 µl Wasser resuspendiert. 5 µl davon, entsprechend 10^6 Zellen, wurden punktförmig auf 37°C warme M199 pH7-Platten aufgebracht und 3 - 4 Tage bei 37°C bebrütet. Filamentierung und Invasivität wurden mit bloßem Auge und bei 10-facher Vergrößerung beurteilt.

2.4.4 Filamentierung und Chlamydosporenbildung auf Reis-Tween-Agar

Zusammensetzung: 15 g Reisextrakt-Agar (Merck)
(pro Liter) 10 ml Tween 80 (Merck) pH7 mit NaOH

Tween 80 provoziert als Detergenz Filamentierung und Chlamydosporenbildung. Verstärkt wird dieser Effekt durch das Abdecken der Z-förmig ausgestrichenen Probe mit einem Deckgläschen, das mikroaerophile Bedingungen erzeugt. Die Bebrütung erfolgt bei 25°C - 28°C. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden Filamentierung und Chlamydosporenbildung bei 10- und 40-facher mikroskopischer Vergrößerung begutachtet.

2.4.5 Färbung auf CHROMagar Candida

Dieser relativ neue Agar von *CHROMagar Company* (Paris, Frankreich) wurde für die Primärisolation und -diagnostik von Hefen konzipiert, erlaubt aber auch mehreren Dermatophyten und Schimmelpilzen das Wachstum. Im Gegensatz zum Sabouraud-Agar ermöglicht er anhand von Koloniefärbung und -morphologie eine erste Speziesdifferenzierung. Vor allem *C.albicans* lässt sich sehr gut an seiner hellgrünen Farbe erkennen, die höchstens mit dem dunkleren grün von *C.dubliniensis* verwechselt werden kann. Keine andere Spezies bildet grüne Kolonien. *S.cerevisiae* beispielsweise ist weiß, *C.glabrata* violett gefärbt. Eine endgültige Identifizierung ist für diese beiden aber nicht möglich, da ihre Koloniefarben auch bei anderen Spezies auftreten.

Zusammensetzung: 10 g Pepton
(pro Liter) 20 g Glucose
15 g Agar
2 g „chromogenic mix“
0,5 g Chloramphenicol

Bei der Primärisolation wird versucht, Einzelkolonien zu erhalten, um Mischinfektionen erkennen zu können. Zur weiteren Diagnostik von Einzelkolonien wird möglichst dicht ausgestrichen, um eine intensive Färbung zu erzielen. Die Bebrütung erfolgt bei 37°C für 48 h.

Da der Standard-CHROMagar einen sauren pH-Wert von 5,5 - 6 aufweist und wir für einige Untersuchungen auf einen neutralen pH angewiesen waren, stellten wir zusätzlich durch Pufferung mit 150 mM HEPES und Titrierung mit NaOH CHROMagar mit pH7 her.

2.4.6 Koloniemorphologie auf Staibagar

Zusammensetzung: 50 g Samen von *Guizotia abyssinica*, gemahlen und gekocht
(pro Liter)
1 g KH_2PO_4
1 g Kreatinin
1 g Glucose
15 g Agar-Agar

Dieser Agar, der eigentlich zur Kryptokokkendiagnostik entwickelt wurde, eignet sich auch sehr gut zur Differenzierung keimschlauchpositiver *Candida*-Spezies.

Die Proben werden jeweils so ausgestrichen, dass möglichst Einzelkolonien entstehen, da deren Beurteilung am sichersten ist. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C werden die Kolonien unter dem Mikroskop bei 10- und 40-facher Vergrößerung betrachtet. *C. albicans* zeichnet sich dabei durch glatte Kolonieränder aus, während *C. dubliniensis* filamentiert und Chlamydosporen bildet. Andere Spezies verhalten sich unterschiedlich, so dass eine Speziesdiagnose allein anhand der Koloniemorphologie auf Staibagar nicht möglich ist.

Auch der normale Staibagar ist mit seinem pH-Wert von 5,5 - 6 leicht sauer. Darum produzierten wir für bestimmte Untersuchungen nach oben beschriebenem Prinzip einen pH-neutralen Staibagar.

2.4.7 Wachstum bei 45°C

Um das Wachstumsverhalten bei 45°C zu überprüfen, wurden äquivalente Mengen der interessierenden Stämme auf vorgewärmten YPD-Agar ausgestrichen und nach 48 h und 72 h Inkubation bei 45°C beurteilt. Längere Inkubationszeiten führen zu einem Austrocknen des Agars und erschweren damit die Beurteilung.

2.4.8 CO₂-Einfluss auf die Koloniemorphologie bei Verwendung besonderer Medien

Zusammensetzung der verwendeten Medien:

Kochblutagar auf GC-Basis (Pecten Dickinson)	7,5 g pankreatisch abgebautes Casein
	7,5 g hochwertiges Fleischpepton
	1,0 g Maisstärke
	4,0 g Dikaliumhydrogenphosphat
	1,0 g Kaliumhydrogenphosphat
	5,0 g Natriumchlorid
	10,0 g Hämoglobin
	0,5 g Wachstumsfaktoren
	12 ml Iso VitaleX
	12,0 g Agar
<i>Kochblutagar auf Mueller-Hinton-Basis</i> (Pecten Dickinson)	2,0 g Rindfleischextrakt
	17,5 g säurehydrolysiertes Casein
	1,5 g Stärke
	17,0 g Agar
	10 ml Iso VitaleX
Blutagar (Bio Merieux)	Columbia Agar mit 5% Schafsblut
	Sabouraud-Agar (pro Liter)
Supplemente :	40 g Glucose
	10 g Bacto-Pepton
	16 g Agar-Agar
	0,0123 g Penicillin
	0,048 g Streptomycin

Zur Untersuchung des CO₂-Effektes wurden Proben von 134 *C.albicans* und *C.dublinsiensis*-Stämmen parallel auf je zwei Kochblut-, Blut- und Sabouraudplatten ausgestrichen. Ein Plattensatz wurde bei 37°C und 5% CO₂, der andere bei 37°C und atmosphärischem CO₂ für 48 h bebrütet. Ein weiterer Satz Kochblutplatten wurde bei 30°C und atmosphärischem CO₂ inkubiert. Die Koloniemorphologie wurde makroskopisch beurteilt.

Zur mikroskopischen Betrachtung wurde bei *C.dubliniensis* etwas Koloniematerial mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in 5 µl H₂O auf einem Objektträger eingerieben. *C.albicans*-Material musste mit der Impföse aus dem Agar gestochen und nach Zugabe von 5 µl H₂O unter dem Deckglas zerrieben werden.

Invasives Wachstum wurde durch Abwaschen der Platten mit leichtem Reiben unter fließendem Wasser überprüft.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.5.1.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Diese Enzyme bakteriellen Ursprungs sind in der Lage, doppelsträngige DNA bei einer für das Enzym spezifischen Sequenz zu schneiden. Die erkannten Sequenzabschnitte haben eine Länge von vier bis acht Basenpaaren und weisen eine doppelte Rotations-symmetrie auf. Die Schnittstellen sind symmetrisch angeordnet und können „blunt ends“, also glatte Enden, oder „sticky ends“, das heißt überlappende Enden besitzen.

Der Verdau erfolgt in den vom Hersteller empfohlenen mitgelieferten Puffern, in der Regel bei einer Inkubationstemperatur von 37°C für 1 h - 2 h. Der Enzymbedarf liegt bei 1 Unit pro µg DNA, wobei der Enzymanteil am gesamten Reaktionsansatz 10% nicht übersteigen sollte, da sonst das Glycerin die Reaktion inhibieren kann.

2.5.1.2 Dephosphorilierung

Zur Verhinderung der Religation eines linearisierten Vektors werden die Phosphatgruppen am 5'-Ende des linearisierten Vektors entfernt. Dazu werden 50 ng linearisierter Vektor mit dem entsprechenden Volumen 10x Dephosphorilierungspuffer und 1 µl, entsprechend 1 U *Shrimp alkaline Phosphatase* gemischt und bei 37°C für 10 min bei „sticky-“, beziehungsweise 60 min bei „blunt-ends“ inkubiert. Die Inaktivierung erfolgt für 15 min bei 65°C. Danach kann der Ansatz sofort zur Ligation eingesetzt werden.

2.5.1.3 Ligation

Die Ligation ist ein enzymatisches Verfahren zur Verknüpfung kompatibler DNA-Enden unter ATP-Verbrauch. Meist findet es Anwendung zur Einfügung eines neuen Inserts in einen linearisierten Vektor.

Ein Ligationsansatz hat in der Regel ein Volumen von 20 µl und enthält neben 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer (NEB) und 1 U T4-DNA-Ligase (NEB) linearisierten Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:3. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Nützlich ist das Mitführen einer Negativkontrolle zur Abschätzung der Religationsrate, die statt Insert nur Wasser enthält.

2.5.1.4 Aufreinigung

Das Standardverfahren zur Reinigung DNA-haltiger Lösungen ist die Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung. Es eignet sich bevorzugt zur Entfernung von Puffersubstanzen und Enzymen nach Verdauung und Ligationen, da es zusätzlich zu einer sofortigen Beendigung der Reaktion führt. Aber auch PCR-Ansätze und verunreinigte genomische DNA lassen sich mit dieser Methode säubern.

Man füllt den vorhandenen DNA-haltigen Ansatz mit Wasser auf 200 µl auf, gibt je 100 µl neutrales Phenol und Chloroform hinzu, vortext kräftig und zentrifugiert anschließend 3 - 5 min bei 14000 rpm, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere, wässrige, DNA-haltige Phase von circa 200 µl wird anschließend abgenommen, mit 2 µl 3 M NaAc (pH 5,2) und 400 µl 100%igem Ethanol versetzt, kurz durchmischt und für 30 min bei -20°C gefällt. Anschließendes 15-minütiges Zentrifugieren bei 4°C führt zur Bildung eines weißlichen, oft schwer erkennbaren Pellets, das nun mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 37°C oder in der Speed vac getrocknet wird, bis das Pellet durchsichtig geworden ist. Zuletzt gibt man ein geeignetes Volumen Wasser hinzu und löst das Pellet kurz bei Raumtemperatur oder bei größeren DNA-Mengen über Nacht bei 4°C.

Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen, Verdauung und Ligationen bietet QIAGEN auch spezielle Kits an, die mit Silicagel-Membranen arbeiten. Aufgrund ihrer Sauberkeit sind sie bei anschließender Sequenzierung sehr geeignet.

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit diesem Verfahren werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Je nach erwarteter Fragmentgröße verwendet man Gele mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,7% für große Fragmente und 1,5% für kleinere. Die abgewogene Agarose wird in der entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf Handwärme in einen Gelträger gegossen. Als Laufpuffer dient ebenfalls 1x TAE. Vor dem Auftragen wird der DNA-Probe noch im Verhältnis 1:10 ein Blaumarker zugesetzt. Dieser dient zur Beschwerung der DNA-Probe und als Laufkontrolle während des Auftrennungsvorgangs. Zur absoluten Größen- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben wird daneben ein Marker aufgetragen, der DNA-Fragmente in bekannter Größe und Konzentration enthält. Die Elektrophorese selbst erfolgt bei einer Spannung zwischen 25 V und 170 V, abhängig von Fragmentgröße und Zielsetzung.

Anschließend wird das Gel für 10 - 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht betrachtet, wodurch das DNA-gebundene Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt wird.

Sollen DNA-Fragmente einer bestimmten Länge nach der Auftrennung weiterverarbeitet werden, muss der entsprechende Gelbereich zunächst mit Hilfe eines Skalpells unter UV-Licht-Kontrolle scharf ausgeschnitten werden. Für die weitere Aufreinigung der DNA-haltigen Gelblöcke steht wiederum ein spezieller Kit der Firma QIAGEN zur Verfügung, der nach dem bekannten Prinzip arbeitet.

20x TAE-Puffer : 242 g Tris-Puffer
 57,1 ml Eisessig (96%)
 37,2 g EDTA

DNA-Auftragspuffer: 1% Bromphenolblau
 1% Xylencyanol
 0,5 M EDTA
 add. Glycerin

2.5.3 DNA-Amplifikation mittels PCR

Mit diesem 1984 von Kary Mullis entwickelten Verfahren kann man DNA-Abschnitte spezifisch vervielfältigen, ohne die Sequenz dieses Abschnittes oder seine genaue Lage im Genom zu kennen. Einzige Voraussetzung ist die Kenntnis eines Bereichs von ca. 20 Basenpaaren stromaufwärts und stromabwärts des zu amplifizierenden Abschnittes, die wie unten genauer erläutert als Primer eingesetzt werden. Der Ablauf einer PCR besteht aus fünf Schritten, von denen die Schritte 2 - 4 zyklisch 15 - 45 Mal wiederholt werden:

1. First Delay: Bei einer Temperatur von 94°C wird die doppelsträngige Template-DNA möglichst vollständig in zwei Einzelstränge zerlegt. Dieser Schritt dauert durchschnittlich 5 min.
2. Denaturierung: Zu Beginn jedes Zyklus werden die neu synthetisierten DNA-Fragmente von ihrer „Matritze“ abgetrennt, um wieder einzelsträngige DNA zu erhalten. Je nach Länge der Fragmente und der Basenzusammensetzung sind dazu 15 - 30 s bei 94°C notwendig
3. Hybridisierung: Die Temperatur des Reaktionsansatzes wird nun schnell auf die sogenannte Annealingtemperatur abgesenkt. Dabei kommt es zu einer spezifischen Anlagerung der Primer an die vorhandenen DNA-Einzelstränge der eingesetzten Template-DNA und der bereits synthetisierten Fragmente. Die Höhe der Annealingtemperatur ergibt sich aus der Länge und der Basenzusammensetzung des Primers nach der Regel: $(G+C) \times 4 + (A+T) \times 2 - 4$. Je nach gewünschter Stringenz kann diese Temperatur auch etwas höher oder niedriger gewählt werden.
4. DNA-Synthese: Anschließend wird die Temperatur auf 72°C erhöht, der optimalen Reaktionstemperatur für die temperaturstabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Diese bindet an die Primer und verlängert sie jeweils am 3'-Ende, das auf den gesuchten DNA-Abschnitt hin gerichtet sein muss. Die Dauer dieses Schrittes ist abhängig von der Länge des zu bildenden DNA-Fragments.
5. Last Delay: In diesem Schritt von 5 - 10 min bei 72°C sollen noch unvollständige DNA-Fragmente komplettiert werden.

Durch die Wiederholung der Schritte zwei bis vier kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA-Sequenz, so dass man bei optimalem Verlauf nach 30 Zyklen 10^7 Kopien erhält.

Reaktionsansatz:	DNA	200 - 500 ng in 0,5 - 1 μ l
	Primer 1	1 μ l (50 pmol)
	Primer 2	1 μ l (50 pmol)
	10x PCR-Puffer	10 μ l
	MgCl ₂	6 μ l
	dNTPs	4 μ l
	Taq-Polymerase	0,5 μ l
	H ₂ O	add. 100 μ l

Zur Ergebniskontrolle werden 10 μ l des Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA

2.5.4.1 Nach Laborprotokoll: Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Dieses Verfahren ist eine schnelle und kostengünstige Methode zur Plasmidisolation, die auch als Screeningverfahren nach Klonierungen gut geeignet ist.

Benötigte Lösungen:

Lösung 1:	50 mM Glucose 25 mM Tris pH 8 10 mM EDTA	Lagerung bei 4°C
Lösung 2:	0,2 M NaOH 1% SDS	frisch anzusetzen
Lösung 3:	29,45 g KAc 11,5 ml Eisessig H ₂ O add. 100 ml	Lagerung bei 4°C

Eine Einzelkolonie des plasmidtragenden Stammes wird in 5 ml LB mit Antibiotikazusatz unter Selektionsdruck über Nacht bei 37°C und Schütteln hochgezogen. 2 ml dieser Übernachtskultur werden dann bei 14000 rpm für 30 s abzentrifugiert, in 100 μ l Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zugabe von 200 μ l des Lyse-puffers Lösung 2 und kurzes Vortexen führt zu einer Zelllyse, die durch ein Aufklaren des

Gemisches sichtbar wird. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis gibt man 150 µl Lösung 3 zur Neutralisation hinzu, vortext wieder kurz und inkubiert für 5 min auf Eis. Bei diesem Schritt bildet sich ein wolkiger Niederschlag, der denaturierte Proteine und die genomische DNA enthält. Durch Zentrifugieren bei 14000 rpm für 3 min wird dieser Niederschlag abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand kann nun abgenommen und nach Zugabe von 800 µl absolutem Ethanol 15 - 30 min bei -20°C gefällt werden. Beim anschließenden Zentrifugieren bei 13000 rpm und 4°C für 10 min bildet sich ein Pellet, das das Plasmid enthält. Dieses wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Speed vac oder bei 37°C getrocknet und in circa 30 µl Wasser gelöst. Der Präparationserfolg wird anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

2.5.4.2 Plasmid Mini-Prep nach QIAGEN

Dieses Verfahren isoliert Plasmide schneller und vor allem mit größerer Reinheit als die Schnellmethode und ist damit vor allem für nachfolgende Sequenzierungen besser geeignet. Das Prinzip beruht auf der Verwendung von Silicagel-Membranen, an die unter den gegebenen Bedingungen nur die Plasmid-DNA adsorbiert.

Folgende Lösungen werden benötigt :

P 1 (Resuspendierungspuffer):	50 mM Tris-HCl pH8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
P 2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH 1% SDS
N 3 (Neutralisationspuffer):	3 M KAc pH5,5
PE (Waschpuffer) :	1 M NaCl 50 mM MOPS pH7 15% Ethanol

Zellyse und Ausfällung von Proteinen und genomischer DNA erfolgen nach dem gleichen Prinzip wie bei der Schnellmethode, die Inkubationsschritte auf Eis entfallen jedoch.

Nach 10-minütigem Zentrifugieren wird der plasmidhaltige Überstand auf eine Silicagel-Anionenaustauschersäule pipettiert und 1 min zentrifugiert. Bei der gegebenen hohen Salzkonzentration adsorbiert dabei die Plasmid-DNA an die Silicagel-Membran, während

RNA, noch vorhandene Zellproteine und Metaboliten sich im Durchfluss befinden. Noch vorhandene Salze werden durch Waschen mit 750 µl PE entfernt. Um die DNA zu eluieren, gibt man 30 - 50 µl Wasser oder Elutionspuffer EB auf die Membran und wartet 1 min. Bei der nun niedrigen Salzkonzentration löst sich die DNA von der Membran und kann durch 1-minütiges Zentrifugieren gewonnen werden.

Die maximale Ausbeute pro Säule beträgt nach Angaben des Herstellers 20 µg. Größere DNA-Mengen überladen die Säule und vermindern die Ausbeute.

2.5.4.3 QIAGEN Plasmid Midi Kit

Zur Präparation größerer Plasmidmengen bis zu 100 µg pro Säule eignet sich der *QIAGEN Plasmid Midi Kit*, der nach dem gleichen Prinzip arbeitet wie der *Mini Kit*. Der Durchfluss durch die Säulen wird hier jedoch nicht durch Zentrifugieren bewirkt, sondern folgt der Schwerkraft. Dazu sind teilweise andere Puffer notwendig.

2.5.5 DNA-Amplifikation in Bakterien

Um DNA-Abschnitte in Bakterien zu vervielfältigen, müssen diese in ein Plasmid integriert sein, das weitere Sequenzbereiche für den Replikationsstart und wenn möglich Gene für Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker enthält.

2.5.5.1 Konstruktion von Plasmiden

Inzwischen wurden einige Plasmidvektoren entwickelt, die oben genannte Voraussetzungen erfüllen und zudem eine „Multiple cloning site“ (MCS) besitzen, in der auf kurze Distanz eine Vielzahl definierter Restriktionsschnittstellen einander folgen. Die Sequenzen dieser Vektoren sind auch außerhalb der MCS im Detail bekannt, so dass sie ein optimales Werkzeug für Klonierungen darstellen.

Um nun ein DNA-Fragment in ein solches Plasmid zu integrieren, werden sowohl Plasmid als auch DNA-Fragment mit den gleichen Enzymen geschnitten um komplementäre Enden zu erzeugen. Sollte dies nicht möglich sein, können durch eine PCR mit Primern, die zusätzlich die Sequenz der gewünschten Schnittstelle enthalten, diese an das DNA-Fragment angefügt werden. Zwei blunt-end-Schnittstellen können unabhängig vom Enzym immer zusammengefügt werden. Mit Hilfe einer Ligase werden die Fragmente dann verknüpft.

2.5.5.2 Transfer von Plasmiden in Bakterien

2.5.5.2.1 Elektroporation

Zunächst werden Küvetten, Elektroporationsschlitten und Plasmidlösung auf Eis gut gekühlt und die elektrokompetenten Zellen schonend auf Eis aufgetaut. Man gibt nun 10 µl der Plasmidlösung zu 40 µl der Zellen und füllt das Gemisch luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette. Durch ein starkes elektrisches Feld, das bei einer Geräteeinstellung auf 400 Ω, 25 µF und 2,5 kV/cm erzeugt wird, ist die Plasmamembran für kurze Zeit permeabel und die Plasmid-DNA kann somit in die Bakterienzelle eindringen. Nach sofortiger Zugabe von SOC-Medium folgt ein Inkubationsschritt für 1 h bei 37°C unter horizontalem Schütteln. Danach können die Bakterien auf LB-Agar ausplattiert werden, dem zur Selektion ein plasmidkodiertes Antibiotikum zugefügt wird.

2.5.5.2.2 Chemische Induktion der Plasmidaufnahme

In unserem Labor wurde bevorzugt mit Calciumchlorid-kompetenten Zellen gearbeitet. Zu jeweils 100 µl dieser Zellen gibt man 10 µl Plasmidlösung und inkubiert das Gemisch für 30 min auf Eis. Während dieser Zeit kommt es zur Anlagerung der Plasmide an die Bakterienzellen. Ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s ermöglicht den Plasmiden das Eindringen in die Bakterien, der folgende 2-minütige Inkubationsschritt auf Eis stabilisiert sie in den Zellen. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wird bei 37°C für 1 h unter Schütteln inkubiert und die Bakteriensuspension anschließend auf antibiotikahaltigen Selektionsplatten ausplattiert.

2.5.5.3 Sonderform : *TOPO-TA-Cloning*[®] Kit

Der *TOPO-TA-Cloning*[®] Kit bietet ein Schnellverfahren zur Integration von PCR-Produkten in ein Plasmid und anschließende Transformation des Vektors in ein Bakterium. Das Klonierungsprinzip beruht auf einer Eigenheit von PCR-Produkten, die am 3'-Ende ein singuläres überhängendes Adenosin aufweisen. Der linearisierte *pCR*[®]2.1-*TOPO*[®]-Vektor besitzt komplementär dazu jeweils ein überhängendes Thymidin am 3'-Ende. In Form einer energiereichen Bindung ist zudem Topoisomerase I, ein Enzym mit Ligaseaktivität, mit der Phosphatgruppe des Thymidin kovalent verknüpft. Spaltung dieser Bindung beim Ligationsprozess liefert die für die Ligation nötige Energie. Praktisch werden 1 µl (10 ng) *pCR*[®]2.1-*TOPO*[®]-Vektor mit 5 - 80 ng unbehandeltem PCR-Produkt gemischt und das Volumen mit Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 1 µl *6x TOPO-Cloning*[®] Stop Solution beendet.

2 µl dieses Ansatzes werden nun zu 50 µl chemisch kompetenten TOP10-Zellen hinzupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 s bei 42°C werden sofort 250 µl zimmerwarmes SOC-Medium zugegeben und das Gemisch für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Anzucht erfolgt dann auf LB-Ampicillin-Platten, die zuvor mit 40 µl X-gal-Stammlösung (40 mg/ml) versehen wurden, um eine blau-weiß-Selektion zu ermöglichen. Positive Klone sind so am nächsten Tag durch ihre weiße Farbe zu erkennen.

2.5.6 Präparation genomischer DNA aus *Candida*-Spezies

frisch anzusetzende Lösungen :

Zymolase-Lösung: 1 M Sorbitol
 50 mM K₃PO₄, pH7,5
 10 mM DTT
 0,04% Zymolase 20T (ICN Biomedicals)

1 M DTT-Stammlösung: 3,09 g DTT (Dithiothreitol)
 in 20 ml 0,01 M NaAc pH5,2

Lösung 1: 50 mM EDTA
 0,2% SDS

Eine Einzelkolonie des gewünschten Stammes wird über Nacht in 15 ml YPD bei 30°C unter Schütteln angezüchtet. Die Übernachtskultur wird dann 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Nach erneutem Abzentrifugieren für 3 min bei 8000 rpm wird das Zellpellet in 800 µl Zymolase-Lösung resuspendiert und für 1,5 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt der enzymatische Abbau der Zellwand durch die Zymolase. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm für 1 min und Waschen des Pellets in 1 ml 1 M Sorbitol schließen sich an. Das durch nochmaliges 1-minütiges Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 min entstandene Pellet wird in Lösung 1 aufgenommen und durch Vortexen vollständig gelöst. Nach Zugabe von je 500 µl neutralem Phenol und Chloroform und kräftigem Vortexen erfolgt ein weiterer Inkubationsschritt für mindestens 1 h bei 37°C und heftigem Schütteln, um während der

ganzen Zeit eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Das anschließende Zentrifugieren bei 14000 rpm für 3 min führt zur Phasentrennung. Die sich oben befindende, wässrige DNA-haltige Phase wird vorsichtig abgenommen und einem erneuten Extraktionsschritt mit je 500 µl Phenol und Chloroform unterzogen. Nach 30-minütiger Inkubation unter Schütteln bei 37°C wird wieder abzentrifugiert und die wässrige Phase zu gleichen Teilen in zwei 1,5 ml-Eppendorf-Caps überführt. Nun wird die DNA mit je 1 ml eiskaltem absolutem Ethanol für 15 min bei -20°C gefällt. 10-minütiges Abzentrifugieren bei 14000 rpm und 4°C führt zur Bildung eines weißlichen Pellets, das mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C oder in der Speed-vac getrocknet wird. Das leicht durchsichtige DNA-Pellet wird nun in circa 100 µl Wasser mit 30 µg/ml RNase aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst. Menge und Qualität der genomischen DNA werden dann auf einem Agarosegel überprüft.

2.5.7 Präparation der Gesamt-RNA aus *Candida*-Spezies

2.5.7.1 nach Laborprotokoll

benötigte Lösungen :

DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrokarbonat
TES-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8 0,5% SDS in DEPC-H ₂ O
10x MOPS	41,8 g MOPS 51 mM NaAc 107,5 mM NaOH 10 mM EDTA add. 1 l DEPC-H ₂ O, pH7 einstellen
	3 M Na-Acetat pH5,2 in DEPC-H ₂ O

Um eine Degradation der RNA durch die ubiquitär vorhandenen RNasen zu verhindern sind einige Vorkehrungen zu treffen. Vor Arbeitsbeginn sind Arbeitsplatz und -geräte mit Ethanol zu reinigen, Lösungen und Verbrauchsmaterialien müssen ebenfalls RNase-frei sein. Alle Arbeitsschritte sind mit Handschuhen, wenn möglich auf Eis durchzuführen.

Über Nacht wird eine Einzelkolonie des gewünschten *Candida*-Stammes in 10 ml YPD bei 30°C angezüchtet. Am nächsten Morgen werden $4,5 \times 10^8$ Zellen der gewaschenen Übernachtskultur in 100 ml M199 mit dem gewünschten pH-Wert angeimpft und für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspensionen werden dann sofort auf Eis gestellt und möglichst schnell bei 4000 rpm und 4°C für 4 min abzentrifugiert, um sowohl eine weitere RNA-Synthese, als auch den RNA-Abbau zu verhindern. Die Pellets werden in 1 ml DEPC-H₂O gewaschen und anschließend in 600 µl TES resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl saurem Phenol und 10-sekündigem Vortexen wird das Gemisch für 1 h unter gelegentlichem Vortexen bei 65°C inkubiert, danach für 10 s in Ethanol/Trockeneis getaucht und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. 600 µl der oberen, wässrigen Phase werden abgenommen und erneut mit 600 µl saurem Phenol extrahiert, wobei der Inkubationsschritt entfällt. Nach erneutem Zentrifugieren werden 550 µl der wässrigen Phase abgenommen, mit 550 µl neutralem Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und 2 min in der Hand geschüttelt. Dieser Schritt wird mit 500 µl der beim Abzentrifugieren entstehenden wässrigen Phase wiederholt und nochmals bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Zur Fällung der RNA werden 400 µl der wässrigen Phase mit 1 ml 100%igem Ethanol und 40 µl 3 M Na-Acetat gemischt und für 1 h bei -20°C inkubiert. 15-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 14000 rpm liefert ein RNA-Pellet, das mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet wird. Das Lösen in durchschnittlich 100 µl DEPC-H₂O kann für circa 5 min bei 65°C erfolgen. Anschließend wird die RNA bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung und Auftrennung der RNA werden spezielle denaturierende Gele benutzt, die einen Abbau der RNA verhindern. Diese Gele enthalten neben 1% Agarose 0,66% Formaldehyd und 1x MOPS, die erst nach Abkühlen des Gels auf Handwärme zugegeben werden dürfen. Als Laufpuffer dient 1x MOPS. Die RNA-Proben werden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:1 mit einem Premix gemischt, der aus 500 µl Formamid, 175 µl Formaldehyd und 100 µl 10x MOPS besteht und nach Zugabe von RNA-Auftragspuffer (1:10) 10 min bei 65°C denaturiert.

RNA-Auftragspuffer 50% Glycerin
0,01% Bromphenolblau
in DEPC-H₂O

2.5.8 Transformation in *Candida*-Spezies

2.5.8.1 Lithiumacetat-Methode

benötigte Lösungen:

10x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH8,0 1 mM EDTA	
10x TAE-Puffer	48,5 g Tris 27,2 g NaAcetat-3 H ₂ O 0,38 g EDTA-Na ₂ add. 1 l	pH8 einstellen mit Essigsäure
10x Lithiumacetat	1 M LiAcetat	pH7,5

50% PEG (Polyethylenglycol)

Aus einer YPD-Übernachtskultur des gewünschten Stammes werden 1×10^8 Zellen in 50 ml frisches YPD überimpft und bis zum Erreichen einer Dichte von 10^7 Zellen/ml bei 30°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 4000 rpm für 4 min wird das Pellet in 500 µl Wasser gewaschen und bei 10000 rpm 1 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird zunächst in 500 µl 1x TE/1x LiAcetat aufgenommen und dann auf eine Zelldichte von 2×10^9 Zellen/ml eingestellt. 50 µl dieser Zellsuspension, 1 µg zu transformierende DNA (10 - 20 µl), 10 µl hitzedenaturierte Lachsperm-DNA und 300 µl 1x TE/1x LiAc/40% PEG bilden den Transformationsansatz, der für 30 min bei 30°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert wird. Die so vorbereiteten Zellen werden nun einem genau 3-minütigen Hitzeschock bei exakt 42°C ausgesetzt und anschließend für 1 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl Wasser gewaschen, in der gleichen Menge aufgenommen, auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert und für 3 - 4 Tage bei 30°C bebrütet.

2.5.8.2 Spheroblasten Transformation

benötigte Lösungen:

SPE	1 M Sorbitol 50 mM K ₃ PO ₄ pH7,5 10 mM EDTA in H ₂ O	
STC	5 mM Tris HCl pH7,4 5 mM CaCl ₂ 0,9 M Sorbitol	
PEG/Tris/CaCl ₂	10 mM TrisHCl pH7,4 10 mM CaCl ₂ in PEG 8000 (20 g PEG in 100 ml H ₂ O)	
SOS	1 M Sorbitol 13 µl 1 M CaCl ₂ 670 µl YPD pH7 2 µl Uridin (25 mg/ml) H ₂ O add 2 ml	frisch anzusetzen
Zymolase-Lösung 0,09 %	22,5 mg Zymolase 20T SPE add 5 ml	frisch anzusetzen

Aus einer YPD-Übernachtskultur des gewünschten Stammes wird eine 200 ml YPD-Subkultur angeimpft und bis zu einer Zellzahl von $2,5 \times 10^7$ pro ml bei 30°C inkubiert. Die gesamte Kultur wird dann 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, das Pellet mit 20 ml 1 M Sorbitol gewaschen und unter gleichen Bedingungen nochmals abzentrifugiert. Die Zellen werden nun in 19,6 ml SPE-Puffer und 40 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und nach Zugabe von 0,4 ml 0,09% Zymolase-Lösung für 12 min bei 30°C inkubiert. Da nun die Zellwand abgedaut ist, darf die Zentrifugation nach den folgenden Waschschritten mit 20 ml 1 M Sorbitol und 10 ml STC jeweils nur bei 2000 rpm und einer Deceleration von 1/0 durchgeführt werden. Zuletzt werden die Zellen in 1,5 ml STC aufgenommen und zu je 100 µl aliquotiert.

Der Transformationsansatz besteht aus 100 µl Zellsuspension, 5 µl denaturierter Lachsspermien-DNA als Carrier und etwa 5 µl Plasmid-DNA. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird 1 ml PEG 8000/Tris/CaCl₂ zugegeben und nochmals 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beim folgenden 10-minütigen Abzentrifugieren ist wieder die Einstellung von 2000 rpm und Deceleration 1/0 zu beachten. Das Zellpellet wird nun in 150 µl SOS resuspendiert und nach 30 - 40 min Inkubation bei 30°C ohne Schütteln auf YNB-Selektivplatten mit 1 M Sorbitol ausplattiert. Positive Klone zeigen sich nach 3 - 5 Tagen.

2.5.9 Radioaktive Verfahren

2.5.9.1 Markieren der Sonden

Die radioaktive Markierung der spezifischen DNA-Sonden wird mit dem *Prime-It® Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) durchgeführt.

25 ng DNA-Template werden mit Wasser auf 24 µl aufgefüllt, 10 µl *random oligonucleotide primers* werden zugegeben, für 5 min bei 95°C denaturiert und nach kurzem Abzentrifugieren sofort auf Eis gestellt. Nun gibt man 10 µl 5x dCTP-Puffer, 5 µl [α -³²P]dCTP (10 µCi/µl) und 1 µl Exo(-)Klenow (5 U/µl) hinzu und inkubiert für 30 min bei 37°C. Zugabe von 2 µl Stop-Mix beendet die Synthesereaktion. Das Aufreinigen der Sonde erfolgt mit dem *QIAquick Nucleotide removal Kit* (QIAGEN), der auf der selektiven Bindungsfähigkeit von Silicagel-Membranen beruht. Mit diesem Protokoll werden Oligonukleotide kürzer als 10 Basen, Enzyme, Salze und freie Nukleotide entfernt, während Oligonukleotide ab 17 Basen Länge an die Membran adsorbiert bleiben und erst am Ende mit 200 µl Elutionspuffer EB aus dieser Bindung gelöst werden. Die maximale Bindungskapazität einer Säule beträgt 10 µg.

Um die Effizienz der Markierungsreaktion zu überprüfen, kann 1 µl der Sonde verdünnt mit 9 µl EB im Szintillationszähler gemessen werden.

5.5.9.2 Northern Blot

Dieses Verfahren dient dem quantitativen Nachweis spezifischer RNA-Fragmente.

In einem denaturierenden Agarosegel wird die Gesamt-RNA aufgetrennt. Das Gel wird dann 30 min in 50 mM NaOH gewaschen und anschließend kurz in 2x SSC geschwenkt.

Um nun die RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran zu transferieren, wird das Gel luftblasenfrei auf eine Frischhaltefolie über einer Glasplatte gelegt. Darauf legt man die Nylonmembran, die sich sofort am Gel festsaugt. Auch hier dürfen keine Lufteinschlüsse entstehen. 3 - 4 Lagen Whatman-Papier, circa 5 cm Papiertücher und eine gefüllte Glasschale als Gewicht komplettieren den Aufbau, der absolut waagrecht sein muss, um einen gleichmäßigen Kapillartransfer zu gewährleisten. Nach 3 h - 4 h kann der Blot abgebaut und die Membran im *UV-Stratalinker* fixiert werden.

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wird die Blotmembran für etwa 1 h mit 20 ml vorgewärmtem Monod-Puffer bei 65°C vorhybridisiert.

Während dieser Zeit wird die radioaktiv markierte Sonde für 5 min im kochenden Wasserbad in Einzelstränge zerlegt und dann sofort auf Eis abgekühlt, um ein erneutes Aneinanderlagern zu verhindern. Nun wird die Sonde zur Membran gegeben und über Nacht bei 65°C unter Rotation inkubiert. Dabei kommt es zu einer spezifischen Anlagerung der markierten Sonde an komplementäre RNA-Bereiche.

Am nächsten Morgen wird die Sonde abgekippt und die Membran aufeinanderfolgend für je ½ h bei 65°C mit 2x SSC/0,1% SDS, 1x SSC/0,1% SDS und 0,5x SSC/0,1% SDS gewaschen, um restliche nicht spezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Danach wird die Membran in Klarsichtfolie gewickelt und mit der DNA-Seite nach oben in eine lichtdichte Röntgenkassette verbracht. In der Dunkelkammer wird ein Röntgenfilm aufgelegt und für einige Stunden bis mehrere Tage bei -20°C „belichtet“.

MONOD-Hybridisierungspuffer:	7% SDS	
	0,5 M NaH ₂ PO ₄	
	1 mM EDTA	
Hybridisierungs-Waschpuffer:	2x SSC, 0,1% SDS	
	1x SSC, 0,1% SDS	
	0,5x SSC, 0,1% SDS	
20x SSC:	3 M NaCl	pH7
	0,5 M Natriumcitrat	

2.5.9.3 Southern Blot

Mit dieser Methode können Existenz, relative Kopienzahl und Lageunterschiede spezifischer Sequenzbereiche im Genom dargestellt werden.

Die genomische DNA des gewünschten Stammes wird zunächst mit einem Restriktionsenzym komplett verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt. Um die DNA in Einzelstränge zu überführen, wird das Gel zweimal 15 min mit Denaturierungspuffer gewaschen. Dem schließt sich zweimaliges 15-minütiges Waschen in Neutralisationspuffer und kurzes Schwenken in 2x SSC an. Das weitere Vorgehen erfolgt wie für den Northern-Blot beschrieben.

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisationspuffer: 1,5 M NaCl pH8 einstellen, mit HCl
1 M Tris

2.5.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wird nach der Kettenabbruchmethode mit dem Sequenziergerät ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer) durchgeführt.

Der Sequenzieransatz besteht aus: 0,4 µg Plasmid-DNA oder 0,1 µg PCR-Produkt
10 pmol Primer
2 µl Sequenzier-Mix
add. 10 µl

Im Sequenzier-Mix enthalten sind neben den vier dNTPs auch in geringerer Menge die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten 2'3'-Dideoxynukleotidtriphosphate. Deren Einbau verhindert durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe die Anknüpfung einer weiteren Phosphatgruppe und führt dadurch zu einem Kettenabbruch. Am Ende der Synthesereaktion, die in ihrem Ablauf einer PCR ähnelt, enthält der Ansatz somit DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, jeweils mit einem basenspezifisch markierten Nukleotid am 3'-Ende.

Dieser Ansatz wird nun in Einzelstränge zerlegt, in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Fluoreszenz am 3'-Ende der verschiedenen langen Fragmente mit einem in das Sequenziergerät integrierten Laserscanner aufgezeichnet. Ist nach jeder Base zumindest einmal ein Kettenabbruch erfolgt, kann aus den Ergebnissen die Basensequenz ermittelt werden.

3. Ergebnisse

3.1 *C.dublinsiensis*-RIM101

Wie bereits im Einleitungsteil dargelegt, zeigen *C.dublinsiensis* und *C.albicans* ein in weiten Bereichen vergleichbares, jedoch nicht völlig identisches Filamentierungsverhalten. Uns stellte sich nun die Frage nach den molekularen Grundlagen dieser Unterschiede, wobei unser besonderes Interesse dem Transkriptionsfaktor Rim101 galt, der bei der pH-induzierten Filamentierung von *C.albicans* eine zentrale Rolle spielt.

3.1.1 Klonierung und Sequenzierung

Da auch *C.dublinsiensis* einen pH-abhängigen Dimorphismus zeigt und zudem mit Cd-*PHR1* und -*PHR2* zwei Komponenten stromabwärts von *RIM101* schon bekannt waren, konnten wir annehmen, dass auch *C.dublinsiensis* ein *RIM101*-Homolog besitzt. Die nun folgende Klonierung und Sequenzierung des entsprechenden Gens erfolgte in Zusammenarbeit mit A. El Barkani.

Dazu leiteten wir zunächst Primer von *C.albicans*-*RIM101* ab, was aufgrund der engen Verwandtschaft dieser beiden Spezies möglich war. Den 3'-Primer entnahmen wir der kodierenden Sequenz, beginnend mit dem TAA-Stopcodon. Um im 5'-Bereich einen Teil des Promotors mitzuklonieren, suchten wir einen Primer circa 500 Basenpaare (bp) stromaufwärts des offenen Leserasters. Da außerhalb der kodierenden Bereiche die Homologien wesentlich geringer sind, führten wir die PCR mit vier verschiedenen 5'-Primern durch, von denen einer, Cd-*PRR2-4*, mit dem *C.dublinsiensis*-DNA-Template eine positive Bande bei 2,5 kb lieferte. Eine kurze Ansequenzierung dieses Fragmentes bestätigte, dass es sich um ein *RIM101*-Homolog aus *C.dublinsiensis* handelte, flankiert von den beiden *C.albicans*-Primern.

Zur Amplifizierung eines reinen *C.dublinsiensis*-*RIM101* wählten wir im 5'-Bereich einen Primer direkt anschließend an Cd-*PRR2-4* aus der gewonnenen *C.dublinsiensis*-Sequenz. Um das komplette 3'-Ende des *C.dublinsiensis*-Gens zu erhalten, testeten wir 10 Primer aus dem 3'-nichtkodierenden Bereich von *C.albicans*, von denen einer, Cd-*PRR2-16*, ein positives PCR-Ergebnis lieferte. Nach der Ansequenzierung waren wir nun in der Lage, auch im 3'-Bereich einen Primer aus der nichtkodierenden Sequenz von *C.dublinsiensis*

findet sich an Position r2 des dritten Zinkfingers, wo *C.albicans* als einzige Spezies ein Prolin besitzt, während das Threonin von *C.dublinsiensis* auch in *Y.lipolytica* zu finden ist. Keine der beiden entspricht aber der Konsensussequenz.

Position	f	c	r	s	m	h	t
	1 2 1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4	1 2 3 4 5 6	1 2 3	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5 6
Konsensus	Y x	C x x	C G K a F x x x s x	L x x	H x x x	H T G E K P	
A.nid-1	L t	C m W q G	C s E K I P t	P E s L Y E	H V C G R	H V G R K S T N N L N	
Y.lip-1	L v	C k W n p	C g k t f g s a E k L Y a	H I C d a	H V G R K c T h N L s		
C.alb-1	f k	C I W s n	C n i i f e t P E i L Y D	H I C d d	H V G R K S s N N L s		
C.d-1	f k	C I W s n	C n i i f e t P E i L Y D	H I C d d	H V G R K S s N N L s		
A.nid-21	L T	C Q W G s	C r T T T V K R D H I T S	H I R V	H V P L K P		
Y.lip-2	L v	C n W d n	C g i v T V K R D H I T S	H I R V	H V P L K P		
C.alb-2	L T	C I W e n	C g T T T V K R D H I T S	H I R V	H V P L K P		
C.d-2	L T	C I W e n	C g T T T V K R D H I T S	H I R V	H V P L K P		
A.nid-3	H K	C D F	C G K A F K R P Q D L K K	H V K T	H A D D S v		
Y.lip-3	y K	C D F	C t K s F K R P Q D L K K	H V K T	H A D D n e		
C.alb-3	f h	C D L	C p K s F K R P Q D L K K	H s K T	H A e D h p		
C.d-3	f h	C D L	C t K s F K R P Q D L K K	H s K T	H A e D h p		

Abb. 3.2 Aminosäuresequenzabgleich der Zinkfingerregion

Abgesehen von der Zinkfingerdomäne finden sich, außer zu *C.albicans*-Rim101, keine auffallenden Homologien zu anderen Vertretern der Rim101-PacC-Familie.

Im N-terminalen Bereich finden sich sechs S/TPXX-Motive, wie sie für viele Transkriptionsfaktoren typisch sind. Der für PacC beschriebene Alaninreichtum (84) ist weder bei *C.albicans* noch bei *C.dublinsiensis* vorhanden. Vielmehr fällt bei *C.dublinsiensis* eine Häufung von Glutaminresten auf, die aber nicht das gleiche Ausmaß erreicht wie in *Y.lipolytica* und in *C.albicans*. Während *Y.lipolytica* in dem kurzen Abschnitt von Aminosäure 9 bis 30 73% Glutaminreste besitzt und *C.albicans* immerhin auch noch 36,5% zwischen Position 101 und 163, sind es bei *C.dublinsiensis* nur noch 30% im Bereich von Aminosäure 105 bis 168. Auch nach der Zinkfingerdomäne findet sich noch dreimal eine Folge von drei, achtmal von zwei Glutaminresten, jedoch keine ausgesprochene C-terminale Häufung, wie sie für PacC beschrieben ist.

Im zentralen Molekülbereich existiert keine der typischen Domänen von *A.nidulans*-PacC. Allerdings kann man mit den Aminosäurebereichen 402 - 419, 502 - 519 und 560 - 577 drei kurze Abschnitte von je 17 Aminosäuren Länge abgrenzen, die einen hohen Serin-Threonin-Anteil von 47 - 58% aufweisen. Dazwischen befindet sich bei Aminosäure 460 - 475 ein 15 Aminosäuren langer Abschnitt mit einem Serin-Threonin-Anteil von 33%. In *C.albicans* sind diese Bereiche nicht so deutlich ausgeprägt.

C-terminal findet sich, wie bei allen Rim101-Homologen, eine Häufung saurer Aminosäuren. Bei *C.dubliniensis* sind dies 29 saure Reste zwischen Position 570 und 655 entsprechend einem Anteil von 34%. Der saure Bereich von *C.albicans* reicht von Aminosäure 568 bis 651 und umfasst einen ED-Anteil von 30%.

Die Identität zu *C.albicans*-Rim101 beträgt für das gesamte Protein 85,0%, die Ähnlichkeit liegt bei 88,8%. Wenn man die Identität von circa 30% zu und zwischen den anderen Rim101-Homologen betrachtet, so erscheint dieser Prozentsatz sehr hoch. Vergleicht man ihn aber mit dem Identitätsgrad bereits abgeglichener Proteine von *C.dubliniensis* und *C.albicans*, der deutlich über 90% liegt, so ist er vergleichsweise doch niedrig.

Die Verteilung der sich unterscheidenden Aminosäuren ist abgesehen von wenigen Ausnahmen über das ganze Protein recht gleichmäßig. Die größte Abweichung stellt der Bereich von Aminosäure 195 bis 338 dar, in den auch die Zinkfingerdomäne fällt und der mit nur zwei Unterschieden eine Identität von 98,6% zeigt. Direkt N-terminal schließt sich ein kurzer Abschnitt von 14 bei *C.dubliniensis* beziehungsweise 12 Aminosäuren bei *C.albicans* an, in dem sich hingegen nur zwei übereinstimmende Aminosäuren finden. Weiterhin auffällig ist noch weiter N-terminal eine Reihung von 9 Glutaminresten bei *C.albicans*, von denen *C.dubliniensis* an entsprechender Position nur drei besitzt. Im Gegenzug findet man im C-terminalen sauren Bereich von *C.dubliniensis* eine Folge von 6 Asparaginsäuren, die bei *C.albicans* völlig fehlen.

Bei den übrigen Aminosäuredifferenzen handelt es sich bei 26 um einen Austausch funktionell gleichwertiger Aminosäuren, bei weiteren 15 stammen die beiden Aminosäuren zumindest aus der gleichen Gruppe.

3.1.2 Aktivität von *C.dubliniensis*-RIM101 in *C.albicans*

Um zu überprüfen, ob *C.dubliniensis*-RIM101 auch in *C.albicans* funktionell aktiv ist, beschlossen wir, sowohl das *C.dubliniensis*-RIM101-Allel aus CBS 7987 als auch das aus HD-03 in eine *C.albicans*-RIM101-Nullmutante zu transformieren.

Dazu schnitten wir jeweils das 2,5 kb-*C.dubliniensis*-RIM101-Fragment über einen *Bam*H I/*Not* I -Verdau aus dem TOPO-Vektor heraus und klonierten es über die gleichen Schnittstellen in pSM2. Dieser Vektor ist ein Abkömmling von pBluescript SK und enthält *C.albicans*-URA3. Die so entstandenen Plasmide pMW1/79 und pMW1/5 mit einer Größe von 9,2 kb wurden mit *Nhe* I linearisiert und in CAR 26 transformiert. Bei diesem Stamm

handelt es sich um die URA-auxotrophe Variante von CAR 2, einer *C.albicans*-*RIM101*-Nullmutanten.

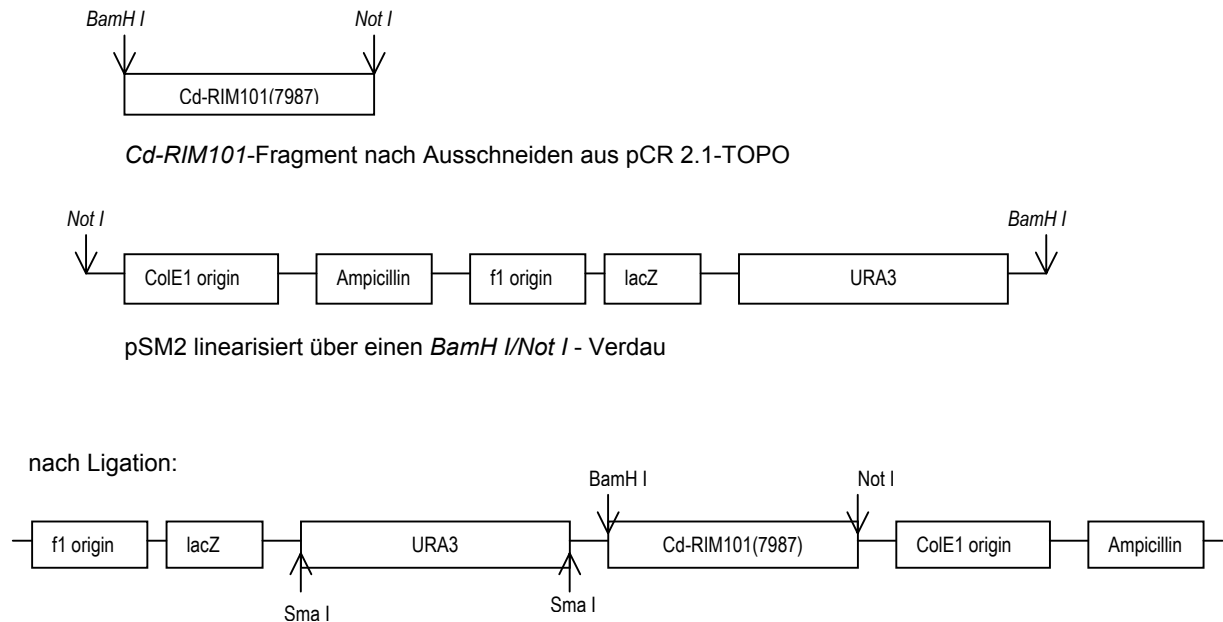


Abb. 3.3 Schematische Darstellung von pMW 1/79

Die primäre Selektion positiver Transformanten erfolgte über die erlangte Uridin-Prototrophie auf YNB-Platten. Von den so erhaltenen Transformanten wurden CMW 5/1, /8, /10, /15 und /18 mit *RIM101* aus HD-03, sowie CMW 79/5, /10, /14, /21, /28 und /33 mit *RIM101* aus CBS 7987, mit Hilfe einer PCR auf Integration des *RIM101*-Fragmentes überprüft. Bei allen zeigte sich die gesuchte Bande bei 2,5 kb, die dem transformierten *RIM101*-Allel entspricht.

Diese sicher positiven Transformanten untersuchten wir nun auf Komplementierung des Filamentierungsdefektes der *RIM101*-Nullmutanten. Da dieser typischerweise in flüssigem M199 pH7, wo fast nur Pseudohyphen gebildet werden, und auf festem M199, wo keinerlei Filamentierung erfolgt, am deutlichsten ausgeprägt ist (66), führten wir unsere Filamentierungsassays mit diesen Medien durch.

In flüssigem M199 zeigte CAR 2 wie erwartet den oben beschriebenen Filamentierungsdefekt einer *RIM101*-Nullmutante. CAR 26, der URA-auxotrophe Ausgangsstamm unserer Transformation, wuchs nur spärlich in M199, so dass sein Filamentierungsverhalten kaum zu beurteilen war. Im Gegensatz dazu bildeten sowohl der *C.albicans*-Referenzstamm SC 5314 als auch die Transformanten im M199-Flüssigassay schon nach

2 h bei 37°C deutlich sichtbare Keimschläuche. Nach längerer Inkubation war die starke Filamentierung schon mit bloßem Auge durch ausgeprägte Klumpenbildung zu erkennen. Bei den zwei überprüften *C.dubliniensis*-Stämmen war ebenfalls echte Keimschlauchbildung zu beobachten, doch verglichen mit den obigen *C.albicans*-Stämmen in wesentlich geringerem Ausmaß.

Auf M199 pH7-Platten waren diese Effekte noch deutlicher. Abb. 3.4 zeigt das Ergebnis nach 72-stündiger Inkubation bei 37°C. Während die Kolonie von CAR 2 absolut scharf begrenzt ist, weisen die Kolonien von SC 5314 und CMW 79/10 einen deutlichen Filamentierungshof auf. Auch hier nimmt CBS 7987 mit seiner leichten Hofbildung wieder eine Mittelstellung ein.

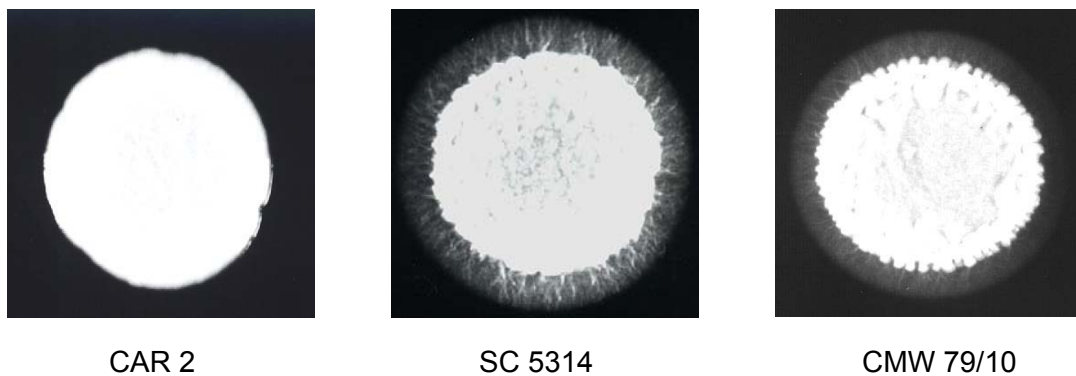


Abb. 3.4 Koloniemorphologie auf M199 nach 72 h Inkubation bei 37°C

Diese Ergebnisse beweisen eindeutig die funktionelle Aktivität von *C.dubliniensis-RIM101* in *C.albicans*. Im unten abgebildeten Northern-Blot konnten wir zudem direkt die Expression von *RIM101* in den Transformanten nachweisen.

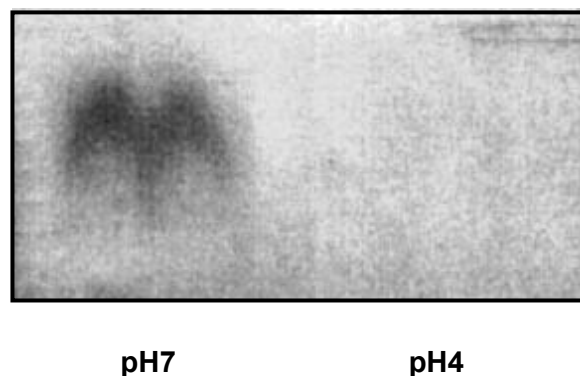


Abb. 3.5 Northern Blot: *RIM101*-Expression in CMW 79/10 nach 60-minütiger Induktion bei 37°C

3.2 CEM 8: Eine *C.albicans*-Mutante mit multiplen Kopien des verkürzten *C.albicans-RIM101*

3.2.1 Phänotypische Charakteristika von CEM 8

El Barkani zeigte in seiner Arbeit, dass multiple *RIM101*-Kopien zu einer Umgehung der Temperaturrestriktion der Filamentierung führen, so dass entsprechende Mutanten auch bei 30°C filamentöses Wachstum zeigen.

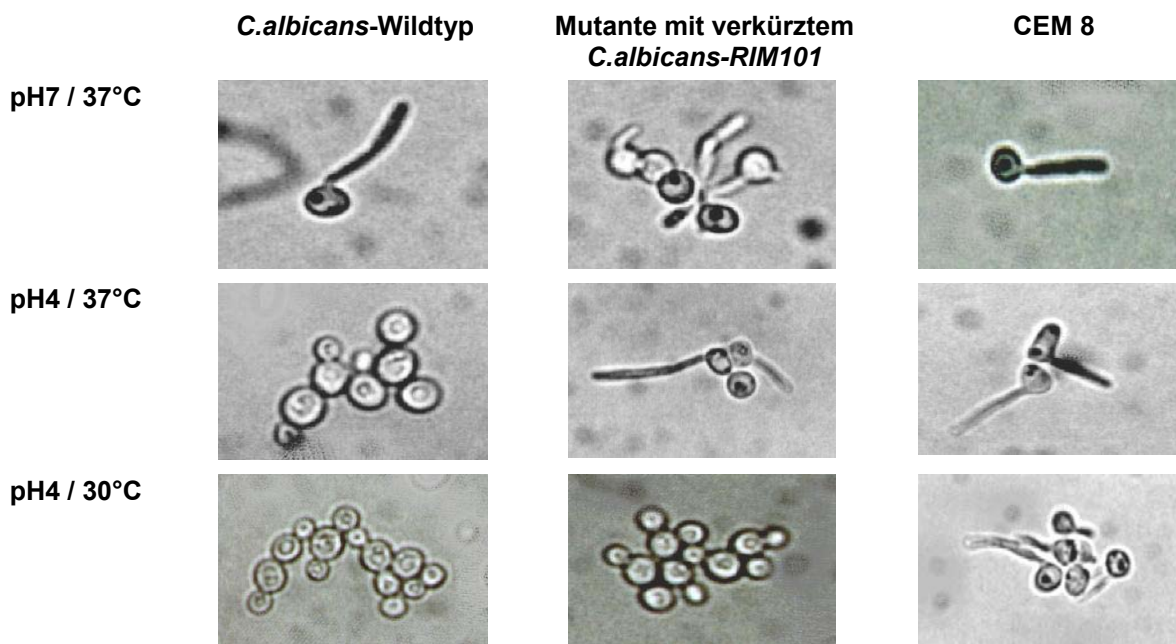


Abb. 3.6 Schematische Übersicht: Wachstumsform in Abhängigkeit von *RIM101* bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

Diese Transformanten untersuchten wir nun auf weitere phänotypische Eigenheiten.

Dazu testeten wir das Verhalten der repräsentativ ausgewählten, genetisch unterschiedlichen *C.albicans*-Transformanten CEM 8, CEM 10, CAF 3-16-1 und CAF 3-31-1 sowie SC 5314 und CBS 7987 als Kontrollstämme auf verschiedenen Medien.

Dabei fiel immer wieder CEM 8 durch seine abweichenden Merkmale auf, die auch in Abb. 3.7 im einzelnen zu sehen sind.

Auf CHROMagar war CEM 8 wie *C.dubliniensis* dunkelgrün gefärbt. Auch CAF 3-16-1 dunkelte verzögert etwas nach, während alle anderen Stämme das helle Grün des *C.albicans* Referenzstammes zeigten.

Bei der Testung auf Staibagar zeigte CEM 8 Filamentierung und Chlamydosporenbildung, wenngleich diese nicht das Ausmaß des *C.dubliniensis*-Stammes erreichten. Im

Vergleich zu den anderen Stämmen, die alle glatt begrenzte Kolonien bildeten, war der Unterschied aber eindeutig.

Die Inkubation bei 45°C lieferte das fast schon erwartete Ergebnis. Auch hier entsprach CEM 8 mit seinem Wachstumsdefizit eher CBS 7987 als den anderen Transformanten, die, wie auch SC 5314, alle gut wuchsen.

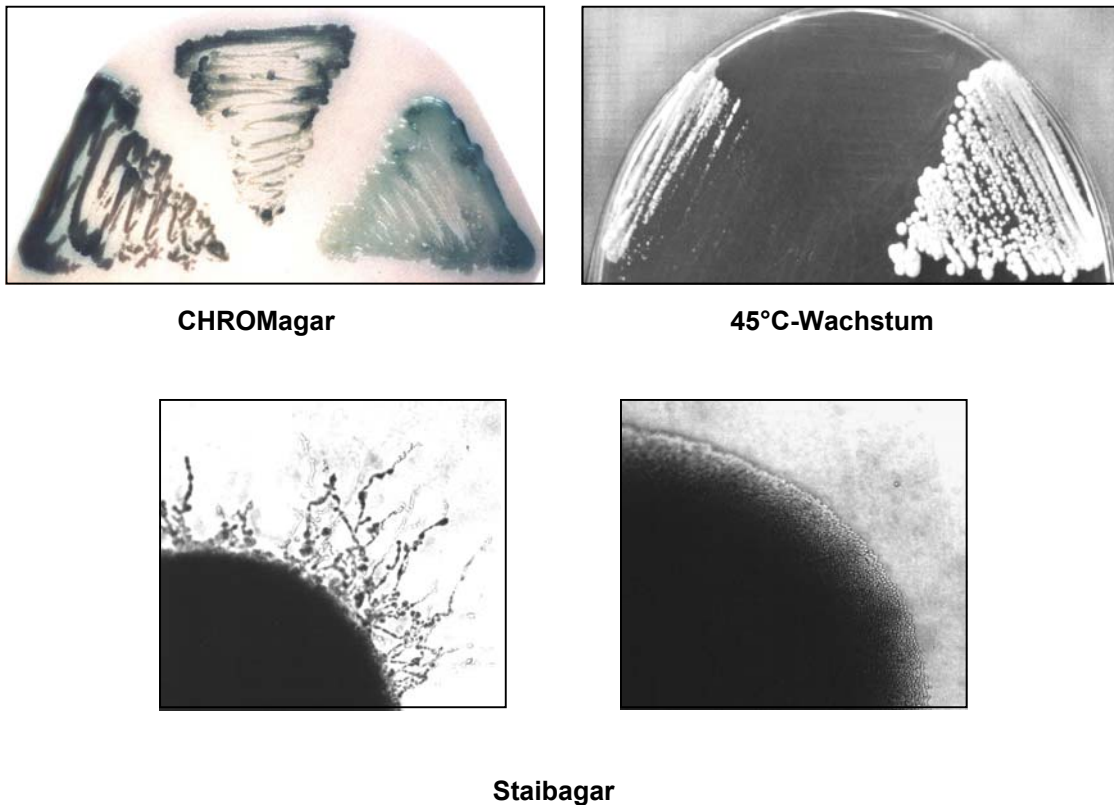


Abb. 3.7 *C. dubliniensis*-Phänotypen bei der *C. albicans*-Mutante CEM 8

Auf Reis-Tween-Agar waren die Ergebnisse nicht so eindeutig. CEM 8 zeigte zwar wiederum ein besonderes Verhalten, das aber keinem anderen Stamm entsprach. Er filamentierte besonders stark, wobei die Filamente bevorzugt aus Pseudohyphen bestanden. An den Spitzen einiger dieser Filamente befanden sich etwa 4 große runde Zellen in einer Reihe, von denen sich die oberste nach 4 Tagen in eine Chlamydospore verwandelte.

Da sowohl Standard-CHROMagar als auch der üblicherweise verwendete Staibagar einen sauren pH-Wert aufweisen und für die Aktivierung des Wildtyp-Rim101 in CAF 3-16-1 und vor allem CAF 3-31-1 ein neutraler bis alkalischer pH notwendig ist, führten wir diese beiden Tests zusätzlich auf Platten mit neutralem pH-Wert durch.

Auf CHROMagar war die dunklere Färbung von CAF 3-16-1 nun stärker ausgeprägt und glich schon fast CBS 7987. CAF 3-31-1 war weiterhin hellgrün. Dafür entwickelte CEM 8 nun eine extrem dunkle, grau-violette Farbe.

Die Testung auf Staibagar pH7 lieferte für CAF 3-16-1 und CAF 3-31-1 weiterhin glatte Kolonieränder. Auch die beiden Referenzstämme und CEM 10 zeigten gleiches Verhalten wie bei Standard-pH. Bei CEM 8 hingegen war sowohl die Filamentierung, vor allem aber die Chlamydosporenbildung deutlich verstärkt und übertraf abschnittsweise sogar die des *C.dubliniensis*-Stammes.

Diesen Untersuchungen zufolge schienen die multiplen verkürzten *RIM101*-Allele CEM 8 einige der für *C.dubliniensis* charakteristischen Eigenschaften zu verleihen. Unterstützt wurde diese Überlegung durch CAF 3-16-1, der zumindest auf CHROMagar eine ähnliche Färbung wie *C.dubliniensis* zeigte.

Da sich die Aminosäuresequenzen von *C.dubliniensis*-Rim101 und *C.albicans*-Rim101 unterscheiden, überprüften wir zunächst, ob in diesen Sequenzabweichungen die Ursache für die phänotypischen Unterschiede zu suchen war.

Dazu testeten wir die schon vorhandenen CMW 5/ und CMW 79/ Transformanten unter den oben beschriebenen Bedingungen. Keiner dieser Stämme wich dabei signifikant vom *C.albicans*-Referenzstamm ab. Bei 45°C war ihr Wachstum zwar gegenüber SC 5314 vermindert, doch zeigte sich das gleiche Wachstumsdefizit auch bei 30°C, so dass es nicht als *C.dubliniensis*-typisch gelten konnte. Die *C.dubliniensis*-*RIM101*-Gensequenz selbst und auch der mittransformierte Promotorbereich von 380 bp direkt stromaufwärts des Startcodons schienen also nicht Träger einer *C.dubliniensis*-spezifischen Information zu sein.

3.2.2 Erneute Transformation

Bislang hatten wir mit CEM 8 nur einen einzigen Stamm, der eindeutig die *C.dubliniensis*-spezifischen Merkmale aufwies. Somit war es denkbar, dass CEM 8 während der Transformation weitere Mutationen akquiriert hatte, die für die besonderen Phänotypen verantwortlich waren. Um dies zu überprüfen, stellten wir in zwei unabhängigen Transformationen weitere Stämme mit multiplen Kopien des verkürzten *RIM101* her und testeten diese bezüglich ihres Farbverhaltens auf CHROMagar pH4 und pH7, auf Wachstum bei 45°C und Filamentierung beziehungsweise Chlamydosporenbildung auf Staibagar.

Ausgangsstämme für die Transformation waren zum einen CAF 3-1 und zum anderen CEM 1, der URA-auxotrophe, *phr2*-negative Mutterstamm von CEM 8.

Insert war in beiden Fällen, wie bei der Herstellung von CEM 8, *Hpa* I-linearisiertes pEM 16-1, ein Plasmid, das neben dem verkürzten *RIM101* das *URA3*-Gen als Selektionsmarker enthält.

Um eine Wiederholung methodischer Effekte auszuschließen, verwendeten wir jedoch mit der Spheroblasten-Transformation ein neues Transformationsverfahren.

Die Primärselektion positiver Transformanten erfolgte jeweils auf YNB pH4, wo nur die *URA*-prototrophen Stämme mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Zudem war bei der gewählten Inkubationstemperatur von 30°C nach 72 h - 96 h schon makroskopisch eine Unterscheidung zwischen den Stämmen mit multiplen Kopien, die aufgrund ihres Filamentierungsvermögens eine gyrierte Kolonieoberfläche aufwiesen, und den glatten Kolonien der nicht-filamentierenden Stämmen mit einfacher Plasmidintegration möglich. Bestätigung lieferte ein Filamentierungsassay in M199 pH4 bei 30°C. Die Kolonien mit gefältelter Oberfläche zeigten schon bei dieser Temperatur Keimschlauch- und schließlich Klümpchenbildung. Positive Transformanten mit glatter Kolonieoberfläche filamentierten hingegen erst bei 37°C.

Das weitere Screening bezüglich der *C.dubliniensis*-spezifischen Eigenschaften führten wir mit sechs Stämmen aus der Transformation in CAF 3-1 und sieben Stämmen aus der Transformation in CEM 1 durch, die multiple Kopien des Plasmids trugen. Zur Kontrolle führten wir die Testung zudem mit drei beziehungsweise zwei Stämmen mit einfacher *RIM101*-Kopie durch.

Auf CHROMagar pH4 wiesen fast alle Stämme mit multipler Plasmidintegration eine etwas dunklere Färbung als SC 5314 auf, waren jedoch deutlich heller als CBS 7987 und CEM 8, wie man auch in Abb. 3.8 b) erkennen kann. Die Stämme mit singulärer Integration waren nicht von SC 5314 zu unterscheiden.

Bei pH7 zeigten die Stämme mit multiplen Kopien eine leichte Violettfärbung, die den Stämmen mit nur einer *RIM101*-Kopie und auch den beiden Referenzstämmen fehlte.

Ein Stamm mit multiplen Kopien, CMW 2-182 aus der Transformation in CEM 1, fiel bei beiden pH-Werten durch gleiches Farbverhalten wie CEM 8 auf: dunkelgrün auf CHROM pH4 und grau-lila bei pH7.

Das Wachstum bei 45°C war mit multiplen Kopien geringfügig reduziert, bei CMW 2-182 wiederum deutlich stärker, jedoch nicht in gleichem Ausmaß wie bei CEM 8.

Auf Staibagar pH7 screenen wir alle positiven Transformanten. Keiner davon, auch nicht CMW 2-182, filamentierte oder bildete Chlamydosporen.

Die bereits auf CHROMagar und bei 45°C überprüften Stämme strichen wir zusätzlich auf Staibagar mit unverändertem pH-Wert aus. Hier konnten wir nun bei CMW 2-182 eine leichte Filamentierung beobachten, allerdings ohne Chlamydosporenbildung.

Mit CMW 2-182 hatten wir einen Stamm, der auf CHROMagar pH4 und pH7, sowie bei 45°C die gleichen Eigenschaften zeigte wie CEM 8. Alle übrigen Transformanten mit multiplen Kopien wiesen qualitativ gesehen ebenfalls diese Merkmale auf, allerdings in wesentlich geringerer Intensität. Bei genauerem Vergleich dieser Stämme untereinander waren noch einmal graduelle Unterschiede in der Merkmalsausprägung erkennbar. Das sprach eindeutig dafür, dass die besonderen Phänotypen von CEM 8 auf CHROMagar und bei 45°C durch die multiplen *RIM*-Kopien hervorgerufen wurden.

Für Staibagar hingegen schien eine derartige Abhängigkeit nicht zu bestehen.

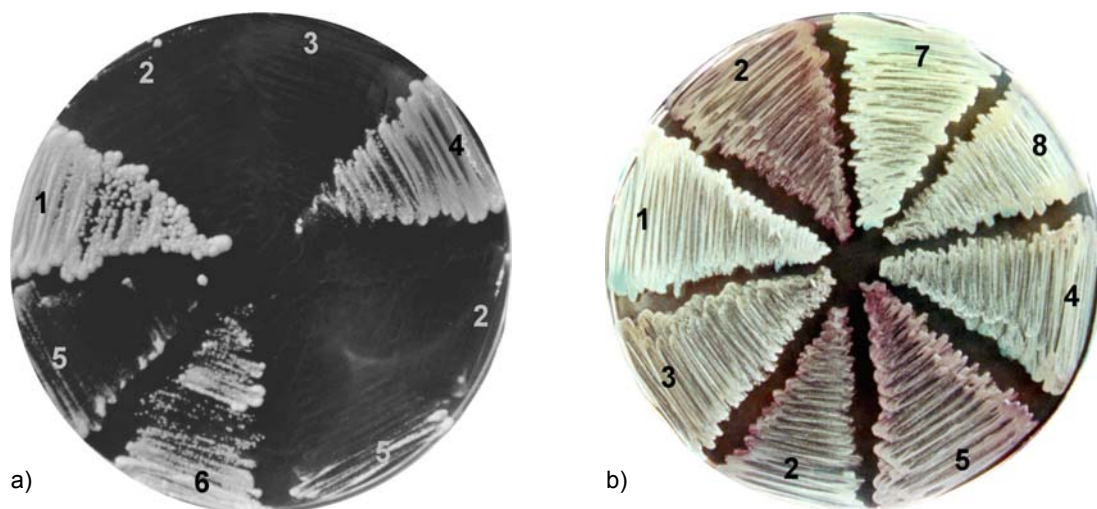


Abb. 3.8 Phänotypen der Transformanten mit multiplern *RIM101*

- a) auf YPD bei 45°C
- b) auf Chromagar pH 7

- 1) SC 5314, 2) CEM 8, 3) Cd 7987, 4) CMW 1-77, 5) CMW 2-182, 6) CMW 2-10, 7) CMW 1-30, 8) CMW 1-31

3.2.3 *RIM101*-Expressionsanalyse

Im nächsten Schritt untersuchten wir die *RIM101*-Expressionsniveaus von CBS 7987, SC 5314, CEM 8 und CMW 1-77 bei pH4 und pH7. Dazu erstellten wir einen Northern Blot, den wir mit einer *C.albicans*-*RIM101*-Sonde hybridisierten. Das Ergebnis ist in Abb. 3.9 dargestellt.

Auffällig war einerseits die extrem starke *RIM*-Expression von CEM 8 sowohl bei pH4 als auch bei pH7. Damit war die vermutete Überexpression, verursacht durch die multiplen Kopien, bewiesen.

Andererseits auffällig war bei pH7 eine deutlich stärkere *RIM*-Expression bei *C.dubliniensis* im Vergleich zu *C.albicans*, der seine bekannterweise schwache *RIM*-Expression zeigt.

Bei pH4 ist bei beiden keine *RIM*-Expression zu detektieren, da beide ja wildtypisches *RIM101* besitzen und dieses alkalisch induziert ist.

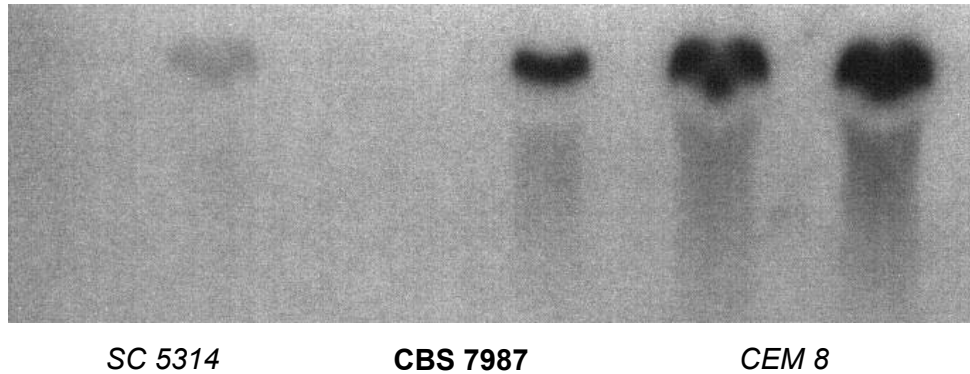


Abb. 3.9 Northern-Blot mit CBS 7987, SC 5314 und CEM 8 bei pH4 und pH7 nach Hybridisierung mit *C.albicans-RIM101*

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass zwar kein qualitativer Unterschied zwischen dem *C.dubliniensis*- und dem *C.albicans-RIM101* besteht, dass es aber wohl einen quantitativen Unterschied im Expressionsniveau gibt, mit einer deutlich stärkeren *RIM*-Expression bei *C.dubliniensis*.

3.2.4 Phänotypischer Array

Um herauszufinden, welche nachgeschalteten molekularen Mechanismen durch die verstärkte *RIM101*-Expression angestoßen werden, führten wir in Zusammenarbeit mit Merlin Diagnostika einen phänotypischen Array durch. Taxa Profile wurde als Ergänzung für die mikrobiologische Taxonomie entwickelt und umfasst in seiner Gesamtheit über 800 biochemische und physiologische Tests, die auf Mikrotitrationsplatten durchgeführt und automatisiert ausgewertet werden können. Wir haben uns auf 570 biochemische Reaktionen beschränkt, die auf drei Platten verteilt durchgeführt wurden. In einem Ansatz, Taxa Profile A, wurde die Verwertung von 191 verschiedenen Aminen, Amiden, Aminosäuren, anderen organischen Säuren, heterozyklischen und aromatischen Verbindungen überprüft. Taxa Profile C untersucht die Verwertung von 191 Mono-, Di-, Tri- und Polysacchariden, sowie Zuckerderivaten. Taxa Profile E schließlich weist anhand der Substratverwertung Aminopeptidasen und Proteasen, glycolytische Enzyme, Phosphatasen und andere Esterasen nach. Zudem werden 17 klassische Reaktionen überprüft.

Die parallele Analyse von CEM 8 sowie den *C.dubliniensis*- und *C.albicans*-Referenzstämmen ergab einige Unterschiede. Diese und die weiteren Ergebnisse sind in tabellarischer Form im Anhang aufgelistet.

In Taxa Profile C fiel die bekanntlich fehlende Methyl- α -D-Glucopyranosid-Verwertung bei *C.dubliniensis* auf.

Die Ergebnisse von Taxa Profile A zeigten ebenfalls einige Speziesunterschiede. Im Detail war das eine fehlende Verwertung von Glycin, Cadaverin, Putescin, γ -Guanidino-Butyrat und Heptanoat bei *C.dubliniensis*. Hier verhielt sich CEM 8 noch wie der *C.albicans*-Referenzstamm. Bei vier weiteren Substraten jedoch zeigte CEM 8 ein von beiden Referenzstämmen abweichendes Verhalten. Er war nicht in der Lage, l-Homocystein, n-Valerat, α -Ketoglutarat und Sebacidsäure zu verstoffwechseln, während *C.dubliniensis* hier wie auch *C.albicans* einen positiven Testausfall zeigte.

Auch in Taxa Profile E lieferte CEM 8 in zwei Reaktionen ein vom Wildtyp abweichendes Ergebnis. Während die Aktivität der Leu-Gly-Aminopeptidase im Assay mit β -Naphthylamid nur für CEM 8 nicht nachweisbar war, fehlte die H-Val-4-M-Aminopeptidase sowohl bei CEM 8 als auch bei *C.dubliniensis*.

Daneben fanden sich auch in Taxa Profile E im Trp- und Phe-Pro-Ala- β -Naphthylamid- Aminopeptidase-Assay, im Lys- und Arg-p-Anilid- Aminopeptidase-Assay, im Glucosidase-Assay bei pH4 mit p-Nitrophenyl α -D- und β -D-Glucopyranosid, im Phosphatase-Assay bei pH4 mit p-Nitrophenylphosphat di(2-amino-2-ethyl-1,3-Propanediol) sowie im Glucosidase-Assay bei pH5 mit p-Nitrophenyl- α -D-Maltosid wieder Speziesdifferenzen, jeweils mit nachweisbaren Reaktionen bei *C.albicans* und CEM 8 und nicht nachweisbaren Reaktionen bei *C.dubliniensis*.

3.3 Differierendes Filamentierungsverhalten von *C.dubliniensis* und *C.albicans* auf Kochblutagar bei erhöhtem CO₂-Gehalt

Stimuliert durch die phänotypischen Unterschiede zwischen *C.albicans* und *C.dubliniensis* haben wir nach weiteren äußeren Bedingungen gesucht, auf die *C.albicans* und *C.dubliniensis* mit der Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen reagieren.

Auf Kochblutagar, nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 24 h - 48 h, bildet *C.dubliniensis* glatte, scharf begrenzte, weiß-glänzende Kolonien. *C.albicans*-Kolonien

hingegen zeigen unregelmäßige Ausläufer, haben eine rauhere Oberfläche und erscheinen eher grau. In Abb. 3.10 a) sind diese Phänotypen zu sehen.

Mikroskopisch entspricht dem ein filamentöses, invasives Wachstum bei *C.albicans*. Entsprechende Kolonien lassen sich nicht von der Platte abwaschen. Kolonien von *C.dubliniensis* bestehen rein aus Hefezellen und lassen sich durch Waschen komplett von der Platte entfernen. Abb. 3.10 b) und c) zeigen diesen Unterschied.

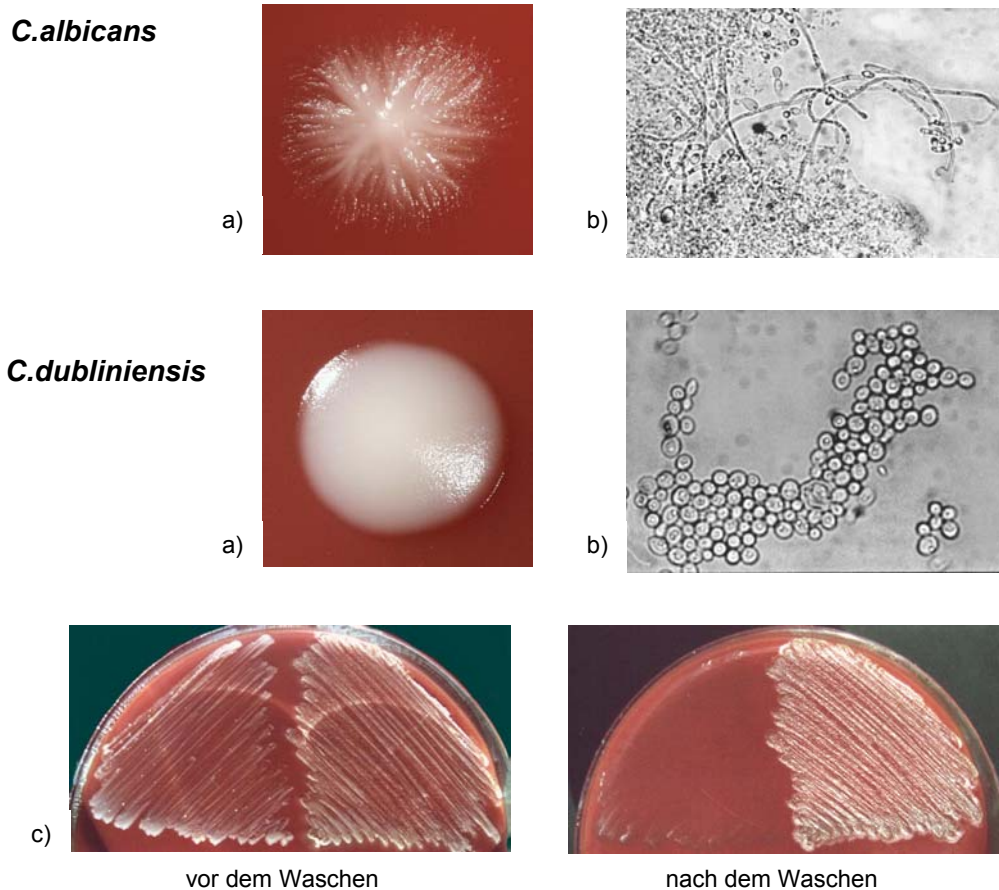


Abb. 3.10 Morphologie von *C.albicans* und *C.dubliniensis* auf Kochblutagar nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂

- a) Makroskopisch
- b) Mikroskopisch (bei *C.albicans* musste Koloniematerial aus dem Agar ausgestochen werden)
- c) Makroskopisch vor und nach dem Waschen

Um die Konstanz der Phänotypen innerhalb der beiden Spezies zu überprüfen, strichen wir 86 *C.albicans* und 48 *C.dubliniensis*-Stämme auf GC-Kochblutagar aus und inkubierten sie unter den angegebenen Bedingungen. 104 dieser Stämme waren Teil einer Studie von O. Kurzai und stammten aus den Mundhöhlen von 45 verschiedenen HIV-Patienten und 17 Transplantierten jeweils mit symptomatischer oraler Candidose aus Hannover (33). 12 Stämme stammten aus einer Studie, die Dr. W. Heinz in Würzburg

durchführte (unveröffentlichte Daten). Bei 17 weiteren handelte es sich um Patientenisolat, die im Rahmen der Routinediagnostik in unserem Institut gefunden wurden. Alle *C.albicans*-Stämme wuchsen invasiv und bildeten Ausläufer. 46 der 48 *C.dubliniensis*-Stämme bildeten glatt-glänzende Hefekolonien. Die übrigen zwei *C.dublinskiensis*-Isolate HD-19 und HD-20 aus der Studie von O. Kurzai (33) bildeten auch bei wiederholter Testung leichte Auswüchse. Im einzelnen sind die Ergebnisse in Tab. 6.2 im Anhang aufgeführt.

Um den Auslöser für das differente Filamentierungsverhalten zu suchen, wiederholten wir das Experiment auf Kochblutagar ohne CO₂, auf Blutagar und Sabouraudagar jeweils mit und ohne CO₂. Auch diese Versuche finden sich in Tab. 6.2. Auf Sabouraud wuchsen sowohl *C.albicans* als auch *C.dublinskiensis* in Form reiner Hefekolonien, unabhängig vom CO₂-Gehalt. Auf Blutagar mit und Kochblut ohne CO₂ zeigten einige *C.albicans*-Stämme Ausläufer, deren Ausmaß allerdings sehr stark variierte. Teilweise waren sie nur vereinzelt zu entdecken, teilweise gleich stark wie auf Kochblut plus CO₂. Im Allgemeinen war bei den einzelnen Stämmen eine gewisse Korrelation der beiden Ergebnisse zu erkennen. Es kam aber auch vor, dass Stämme, die auf Kochblut relativ ausgeprägte Ausläufer bildeten, auf Blutagar fast glatte Kolonien zeigten und umgekehrt. Das durchschnittliche Ausmaß der Ausläufer war unter den beiden Bedingungen vergleichbar. Inkubation auf Blutagar ohne CO₂ lieferte lediglich bei ein paar *C.albicans*-Stämmen minimale Auswüchse.

Für Kochblut ohne CO₂ untersuchten wir zusätzlich den Temperatureinfluss auf die Merkmalsausprägung. Es ergab sich eine deutlich stärkere Ausläuferbildung bei 37°C im Vergleich zu 30°C (vgl. Tab. 6.2).

Weiterhin testeten wir den Effekt auf einem Kochblutagar, der auf Mueller-Hinton- statt auf GC-Basis hergestellt war und weniger Zusätze besaß. Bei Inkubation unter 5% CO₂ waren auch auf diesem Agar, wie in Tab. 3.1 zu sehen, deutlich die Unterschiede zwischen *C.albicans* und *C.dublinskiensis* zu erkennen, wenngleich die Ausläufer von *C.albicans* nicht ganz so ausgeprägt waren.

Wie oben bereits beschrieben, inkubierten wir die Platten für 24 h – 48 h. Bei genauer Betrachtung war eine Diagnose schon nach 24 h möglich. Stämme, die bis dahin noch keinerlei Auswüchse zeigten, bildeten auch in den nächsten 24 h keine mehr. Nach 48 h waren die Unterschiede aber wesentlich deutlicher und einfacher zu erkennen.

Tab. 3.1 Filamentierungsverhalten ausgesuchter Stämme bei Verwendung von Kochblutagar auf Müller-Hinton-Basis.

Stamm (fortl. Nr.)	Spezies	mit CO ₂	ohne CO ₂
1	<i>C.albicans</i>	++	+/-
2	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-
4	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-
5	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-
7	<i>C.albicans</i>	++	-
8	<i>C.albicans</i>	+	-
9	<i>C.albicans</i>	+	-
19	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-
20	<i>C.albicans</i>	+	-
24	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-
25	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-
26	<i>C.albicans</i>	++	-
27	<i>C.albicans</i>	++	-
28	<i>C.albicans</i>	+	-
29	<i>C.dublinsiensis</i>	-	-

Unser weiteres Interesse galt vor allem den molekularen Regelkreisen, die an der Filamentierung unter den angegebenen Bedingungen beteiligt sind. Von drei Transkriptionsfaktoren war uns bekannt, dass sie unter bestimmten Umständen auf die Filamentierung einwirken: Rim101, das schon ausführlich beschrieben wurde, Efg1, das unter anderem stromabwärts von Rim101 agiert, und Cph1. Singuläre *C.albicans*-Knock-out-Mutanten dieser drei Gene und eine *efg1/cph1*-Doppelnullmutante testeten wir nun auf Kochblut- und Blutagar jeweils mit und ohne CO₂.

Auf Kochblutagar mit CO₂ bildeten alle Einzelmutanten Ausläufer, die *rim101*- und *cph1*-Deletionsmutanten stärker als die *efg1*-Nullmutante. Die *efg1/cph1*-Doppelmutante hingegen zeigte die gleichen glatt-glänzenden Kolonien wie *C.dublinsiensis*. Auf Blutagar mit und Kochblutagar ohne CO₂ fanden wir nur bei den *rim101*- und *cph1*-Nullmutanten leichte Auswüchse, die Kolonien der beiden anderen Stämme waren glatt. Weiterhin überprüften wir unsere *C.dublinsiensis-RIM101* in *C.albicans*-Transformanten. Sie bildeten durchschnittlich starke Auswüchse auf Kochblut mit CO₂ und ebenfalls leichte Ausläufer auf Blutagar mit und Kochblutagar ohne CO₂, wiesen also keine Besonderheit gegenüber *C.albicans*-Wildtypstämmen auf.

Auch das Vorhandensein multipler konstitutiv aktiver *RIM101*-Kopien in CEM 8 und CMW 1-77 beeinflusste die Koloniemorphologie unter den getesteten Bedingungen nicht.

Tab. 3.2 Filamentierungsverhalten bei Stämmen mit besonderer genetischer Ausstattung

Stamm	genet. Eigenschaften	KB CO ₂	KB	B CO ₂	B
CDB 1-pSM2	$\Delta efg1/\Delta cph1$	-	-	-	-
JKC 18-pSM2	$\Delta cph1$	+++	+/-	+/-	-
HLC 67-pSM2	$\Delta efg1$	++	-	-	-
CAR 2	$\Delta rim101$	+++	+/-	+/-	-
CMW 5/1	<i>C. dubliniensis</i> - <i>RIM101</i> (aus HD-03)	+++	+	+/-	-
CEM 8	(pBSK+- <i>RIM101</i> -1426- <i>URA3</i>) n>2 <i>RIM101</i> -1426/ <i>RIM101 phr2</i> Δ	+++	+/-	+	-
CMW 1-77	(pBSK+- <i>RIM101</i> -1426- <i>URA3</i>) n>2 <i>RIM101</i> / <i>RIM101</i>	+++	+	+/-	-

4. Diskussion

4.1 Rim101-abhängige Phänotypen bei *C.albicans* und *C.dubliniensis*

Mitglieder aus der Familie der Zinkfingertranskriptionsfaktoren, zu denen auch Rim101 gehört, sind unter den Eukaryonten weit verbreitet und wurden „von der Hefe bis zum Menschen“ in bislang jeder untersuchten Spezies gefunden (79).

Im Pilzreich spielen Zinkfingertranskriptionsfaktoren häufig eine entscheidende Rolle in der Reaktion auf den pH-Wert der Umgebung. Selbst bei *S.cerevisiae*, dessen *RIM101* pH-unabhängig exprimiert wird und der keinen pH-abhängigen Morphologiewechsel zeigt, ist die Rim101-Aktivierung pH-abhängig, und das Wachstum bei alkalischem pH steht unter Rim101-Kontrolle (23).

Neben dieser Funktion in der pH-Signaltransduktion haben die einzelnen Vertreter der Rim101/PacC-Familie in den verschiedenen Spezies noch weitere, sehr unterschiedliche Aufgaben (68).

PacC von *A.nidulans* reguliert beispielsweise zusätzlich Konidienbildung, Pigmentation, Nutzung von Stickstoffquellen und die Penicillinsynthese (68).

In *Y.lipolytica* ist YIRim101 notwendig für Paarung und Sporulation, und auch bei *S.cerevisiae* ist die Sporulation Rim101-abhängig (68).

Unser Ziel war es nun festzustellen, ob auch *C.dubliniensis* ein Rim101-Homolog besitzt, um dann einerseits dessen Rolle in der pH-Regulation genauer zu definieren und andererseits mögliche Rim101-vermittelte Funktionen außerhalb der pH-Signaltransduktion zu finden.

4.1.1 Klonierung und Identifizierung von *C.dubliniensis*-RIM101

Wie bei den bereits bekannten PacC/Rim101-Homologen besitzt auch bei *C.dubliniensis* der erste Zinkfinger mit seinem ungewöhnlich langen Linker von 12 statt 7 Aminosäuren eine vom Konsensus stärker abweichende Struktur. Die zwei essentiellen Cystein- und Histidinreste, sowie die für korrekte Faltung außerdem wichtigen hydrophoben Reste an den Positionen f1, s1 und m1 sind jedoch erhalten. Die zwei letzteren entsprechen mit Phe an s1 sowie Leu an m1 sogar der Konsensussequenz von Jacobs, so dass auch Zf 1 sicher die Faltung eines Zinkfingers besitzt. Wahrscheinlich hat dieser aber auch bei *C.dubliniensis* nur eine räumlich stabilisierende Wirkung und selbst keinen Basenkontakt.

Dafür sprechen zum einen der ungewöhnlich lange Linker, vor allem aber die beiden Tryptophanreste an identischen Positionen von Zf 1 und 2, die hochkonserviert sind und über hydrophobe Interaktionen für die Orientierung der Zinkfinger zueinander verantwortlich sind.

Die für den Basenkontakt verantwortlichen Aminosäuren im N-terminalen Bereich der α -Helices von Zf 2 und 3 sind bei allen Mitgliedern der Rim101-PacC-Familie identisch, so dass wohl auch *C.dubliniensis*-Rim101 die Konsensussequenz GCCARG erkennt. Im Detail sind wohl Lysin, Asparaginsäure und Histidin an den Positionen -1, 2 und 3 der α -Helix von Zf2 für die Erkennung der Gs in der ersten Hälfte der Konsensussequenz zuständig. Glutamin an Position 2 des dritten Zinkfingers erkennt das essentielle A₄, Asp und Lys an 3 und 6 das C bzw. G des letzten Basenpaares.

Der Aminosäuresequenzabgleich mit *C.albicans*-Rim101 lieferte eine Identität von 85%.

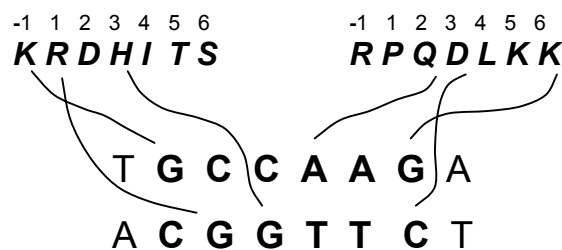


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der spezifischen Basenerkennung durch die Aminosäuren der α -Helices von Zf 2 und Zf 3. Modifiziert nach Espeso

4.1.2 Bedeutung der Sequenzunterschiede von *C.dubliniensis*- und *C.albicans*-Rim101 für die pH-Signaltransduktion bei *C.dubliniensis*

Auf den ersten Blick erscheint der gefundene Identitätsgrad auf Aminosäurenebene von 85% zwischen *C.albicans*- und *C.dubliniensis*-Rim101 zwar sehr hoch, vergleicht man ihn aber mit dem bereits abgeglichenen Proteine von *C.albicans* und *C.dubliniensis*, der bei weit über 90% liegt, so ist er doch deutlich geringer. Bedenkt man zudem die durchschnittlich nur 30% Identität zu und zwischen den anderen Vertretern der Rim101/PacC-Familie, der sich zudem größtenteils auf den Zinkfingerbereich beschränkt, so scheint Rim101 generell außerhalb dieser Domäne ein nur geringgradig konserviertes Protein zu sein, obwohl seine grundlegende Funktion in der pH-abhängigen Geninduktion in den meisten Spezies identisch ist.

Eine mögliche Ursache dafür wäre, dass die Funktion von Rim101 als Transkriptionsfaktor in der pH-Regulation praktisch allein durch die Zinkfingerdomäne bestimmt wird, während der Rest des Proteins nur für die Aktivitätsregulation nötig ist. Da diese an vielen Stellen wohl nicht auf eine spezifische Aminosäuresequenz angewiesen ist, führen viele zufällig akquirierte Punktmutationen zwar zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz, nicht aber zu einer Beeinträchtigung der spezifischen Funktion des Proteins. Ohne negative Selektion können sich diese relativ schnell im Gen anhäufen und so die doch beträchtlichen Sequenzunterschiede bedingen.

Unterstützt wird diese Theorie einer geringen funktionellen Bedeutung der Sequenzunterschiede durch das Verhalten unserer Transformanten mit *C.dubliniensis-RIM101* in *C.albicans*, die trotz der doch beträchtlichen Sequenzunterschiede von *C.albicans*- und *C.dubliniensis*-Rim101 außerhalb des Zinkfingerbereichs in den untersuchten Rim101-Funktionen komplett dem Wildtyp entsprachen. Sie zeigten in M199 bei pH4 keine Keimschlauchbildung, filamentierten aber wie der Wildtyp bei pH7, im Gegensatz zur *rim101*-Nullmutanten, die auch bei diesem pH rein in der Hefeform wuchs (vgl. Abb. 3.4).

Da die Keimschlauchbildung unter diesen Bedingungen bei *C.albicans* von der Induktion und Aktivierung von Rim101 abhängig ist, muss bei alkalischem pH-Wert in diesen *C.albicans*-Transformanten nun das *C.dubliniensis-RIM101* induziert und aktiviert worden sein. Das wiederum setzt voraus, dass die Aktivierungskaskade von *C.albicans* um Rim8 und Rim20 auch das *C.dubliniensis*-Rim101 erkennt und modifiziert, *C.dubliniensis*-Rim101 also durch den gleichen Mechanismus aktiviert werden kann wie *C.albicans*-Rim101. Die beobachteten Sequenzunterschiede haben also keine Auswirkung auf die Induzier- und Aktivierbarkeit des Proteins durch die *C.albicans*-Rim101-Aktivierungskaskade. Bestätigt wird das durch den Northern-Blot, der für CMW 79/10 bei pH4 keine, bei pH7 aber eine deutlich erkennbare *RIM101*-Bande zeigt (vgl. Abb. 3.5). Auch *C.dubliniensis-RIM101* ist also in *C.albicans* ein alkalisch induziertes Gen.

Da, wie oben gezeigt, *C.dubliniensis*-Rim101 durch den gleichen Mechanismus aktiviert werden kann wie *C.albicans*-Rim101 und zudem das Expressionsniveau von *C.dubliniensis-RIM101* in *C.dubliniensis* selbst die gleiche pH-Abhängigkeit zeigt wie in *C.albicans*, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass auch in *C.dubliniensis* eine vergleichbare Rim101-Aktivierungskaskade vorhanden ist.

C.dubliniensis besitzt also einerseits mit *C.dubliniensis-RIM101* neben den schon bekannten *C.dubliniensis-PHR1* und *-PHR2* auch ein Homolog des zentralen Bestandteils der pH-Signaltransduktionskaskade von *C.albicans*. Weiterhin scheint, wie oben dargestellt, auch der Aktivierungsablauf über eine Kaskade vorgeschalteter Faktoren konser-

viert zu sein. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die gesamte pH-Signaltransduktionskaskade, wie sie in *C.albicans* bekannt ist, auch in *C.dubliniensis* existiert.

4.1.3 Bedeutung von Rim101 für die Ausprägung *C.dubliniensis*-spezifischer Phänotypen

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, sind *C.dubliniensis*- und *C.albicans*-Rim101 bezüglich ihres Aktivierungsmechanismus und ihrer Auswirkung auf die pH-induzierte Filamentierung austauschbar. CEM 8, eine *C.albicans*-Transformante, die sich durch multiple Kopien eines konstitutiv aktiven *C.albicans*-*RIM101* auszeichnet, zeigt aber sowohl auf CHROMagar als auch bei 45°C und auf Staibagar eindeutig *C.dubliniensis*-Phänotypen. Rim101 scheint also neben den bekannten Funktionen in der pH-Regulation und Filamentierung zusätzlich an der Ausprägung dieser Phänotypen beteiligt zu sein, und zudem müssen hier Unterschiede zwischen *C.albicans* und *C.dubliniensis* existieren. Da bei *C.albicans* multiple *RIM101*-Kopien notwendig sind, um den *C.dubliniensis*-Phänotyp zu erhalten, und da wir bei weiteren Transformanten mit multiplen *RIM101*-Kopien diese Merkmale in unterschiedlichen Ausprägungsgraden zwischen dem *C.albicans*- und dem *C.dubliniensis*-Phänotyp gefunden haben, spricht das für einen quantitativ gearteten Unterschied.

Auch ein solcher quantitativer Effekt könnte jedoch auf qualitative Unterschiede des Rim101 der beiden Spezies zurückgehen. So wäre es möglich, dass *C.dubliniensis*-Rim101 eine stärker induzierende Wirkung auf bestimmte Gene ausübt, was dann zur Ausprägung der *C.dubliniensis*-Phänotypen führt. Da unsere Transformanten wie CMW 5/1 trotz des *C.dubliniensis*-*RIM101* aber in Bezug auf diese Merkmale alle *C.albicans*-Phänotypen ausbildeten, ist diese Theorie unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit ist die Existenz quantitativer Unterschiede im Expressionsniveau von *RIM101* bei *C.albicans* und *C.dubliniensis*, wie sie der durchgeführte Northern-Blot mit einer deutlich stärkeren *RIM*-Expression bei *C.dubliniensis* im Vergleich zu *C.albicans* auch bestätigte (vgl. Abb. 3.9).

Ursache für diese stärkere *RIM*-Expression könnte ein bei *C.dubliniensis* aktiverer Promotor sein.

Dabei ist der verantwortliche Bereich aber sicher nicht unmittelbar stromaufwärts des offenen Leserasters (open reading frame, ORF) zu finden, da dieser bei der Transformation in *C.albicans* mittransformiert wurde und die Transformanten ja alle *albicans*-Phänotypen

aufwiesen. Der Northern-Blot mit der sehr schwachen *RIM101*-Expression bei diesen Transformanten bestätigt das.

Trotzdem wäre durchaus denkbar, dass im weiter stromaufwärts gelegenen Promotorbereich von *C.dubliniensis-RIM101* Rim101-Bindungsstellen mit höherer Affinität oder höherer Wirksamkeit vorhanden sind als im Promotorbereich von *C.albicans*.

Für PacC ist die Existenz solch unterschiedlich effizienter Bindungsstellen bereits sicher nachgewiesen. So findet man im Promotor des Isopenicillin N Synthetase-Gens von *Aspergillus nidulans* vier PacC-Bindungssequenzen, von denen eine, IpnA1, gar nicht an der Aktivierung beteiligt ist. Die anderen drei unterscheiden sich sowohl in ihrer Affinität zu PacC als auch in ihrem Induktionseffekt. Während IpnA2 im Vergleich zu IpnA3 und IpnA4AB eine fünfmal höhere Affinität zu PacC aufweist, ist die induktive Wirksamkeit der beiden letzteren je 2,5 mal stärker als die von IpnA2 (18).

Als Ursache für den Affinitätsunterschied kommen, wie später noch dargestellt, einzelne Punktmutationen im Core-Hexamer und den zwei flankierenden Basenpaaren in Frage.

Die induktive Effizienz der einzelnen Bindungsstellen ist, wie hier am IpnA-Promotor zu sehen, unabhängig von der Affinität und könnte, wie Espeso (18) diskutiert, von der Lage der jeweiligen Bindungsstelle innerhalb des Promotors abhängen.

Bei der großen Ähnlichkeit im Zinkfinger- und damit DNA-Bindungsereich von PacC und Rim101 von *C.albicans* und *C.dubliniensis* ist die Existenz von Rim101-Bindungsstellen mit unterschiedlichem Wirkeffekt ebenfalls sehr gut möglich und könnte bei Lokalisation im Promotor von *RIM101* selbst die Expressionsunterschiede bewirken.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass zwar beträchtliche Differenzen in der Aminosäuresequenz von *C.albicans*- und *C.dubliniensis*-Rim101 bestehen, diese qualitativen Unterschiede aber die Ausprägung der *C.dubliniensis*-spezifischen Eigenschaften nicht beeinflussen.

Die bestehenden quantitativen Unterschiede im Expressionsniveau hingegen scheinen sehr wohl Einfluss auf die Ausbildung dieser Merkmale zu haben, denn *C.albicans*-Transformanten mit verstärkter *RIM101*-Expression durch multiple konstitutiv aktive Allele zeigen die *C.dubliniensis*-spezifische Ausprägung dieser Merkmale. Dabei handelt es sich aber nicht um einen „Alles oder Nichts“-Effekt, bei dem entweder der *C.albicans* oder der *C.dubliniensis*-Phänotyp ausgebildet wird. Vielmehr existieren, je nach Kopienzahl und damit Expressionsniveau, auch alle Ausprägungsgrade dazwischen.

4.1.4 Mögliche molekulare Auswirkungen der verstärkten *RIM101*-Expression unter Berücksichtigung der Ergebnisse des phänotypischen Arrays

Unsere Intention war es nun, mit Hilfe des phänotypischen Arrays Stoffwechselreaktionen zu finden, in denen unsere Mutante CEM 8 ein vom *C.albicans*-Wildtyp abweichendes Verhalten zeigte, um dadurch den molekularen Bindegliedern zwischen der verstärkten *RIM101*-Expression einerseits und den sichtbaren phänotypischen Effekten Dunkelfärbung auf CHROMagar und Wachstumsdefizit bei 45°C andererseits auf die Spur zu kommen.

Bezüglich des Erscheinungsbildes auf CHROMagar ließe sich die dunklere Färbung von *C.dublinsiensis* und der Mutanten durch Induktion eines Enzymes erklären, das durch Modifizierung einer chromogenen Substanz einen dunklen Farbstoff produziert. Entsprechende Hinweise in Form enzymatischer Reaktionen, die bei *C.dublinsiensis* und CEM 8 positiv, bei *C.albicans* hingegen negativ sind, fanden wir im phänotypischen Array allerdings nicht.

Umgekehrt könnte auch die reduzierte Aktivität eines Enzymes, das an der Entstehung des hellgrünen Farbstoffes beteiligt ist, für die dunklere Farbe verantwortlich sein. Rim-vermittelte Repression dieses Enzymes führt dann auch bei den Transformanten zu verminderter Grünfärbung. Hier liefert Taxa Profile E mit der nur beim *C.albicans*-Wildtyp nachweisbaren Aktivität der H-Val-4-M-Amino-peptidase eine Reaktion, die möglicherweise mit dieser Hypothese vereinbar wäre. Dieses Enzym könnte beispielsweise notwendig sein, um ein im CHROMagar enthaltenes Peptid in die „stoffwechselaktive“ Form zu überführen und somit den Prozess für die Entstehung des hellgrünen Farbstoffes in Gang zu setzen. Fehlende Enzymaktivität bei *C.dublinsiensis* und CEM 8 verhindert dann diesen Vorgang, wodurch die Kolonien dunkel gefärbt erscheinen.

Unklar bleibt jedoch, warum bei saurem pH, wo das *RIM101*-Expressionsniveau bei *C.dublinsiensis* deutlich geringer ist als bei CEM 8, beide fast die gleiche Farbe aufweisen, während bei ähnlich starker RIM-Expression im alkalischen pH-Bereich CEM 8 und CMW 2-182 wesentlich dunkler gefärbt sind als *C.dublinsiensis*. Möglich wäre eine Veränderung der chromogenen Eigenschaften des Mediums, das nun bei pH7 auf Aktivitätsunterschiede von Rim101 auf hohem Niveau sensibler reagiert und somit die immer noch stärkere RIM-Expression der Transformanten im Vergleich zu *C.dublinsiensis* zum Tragen kommt. Möglich wäre aber auch ein breiteres Wirkungsspektrum des *C.albicans*-Rim101-Systems, das stromabwärts auf ein größeres Repertoire von Enzymen und Stoffwechsel-

prozessen wirkt, als das in *C.dubliniensis* der Fall ist. Damit käme es in CEM 8 und den übrigen Transformanten mit multiplen *RIM101*-Kopien zur Induktion oder Repression von Enzymen, die bei *C.dubliniensis* gar nicht und beim *C.albicans*-Wildtyp aufgrund der schwachen *RIM*-Expression nur minimal induziert beziehungsweise reprimiert werden und somit zur Entwicklung eigener Phänotypen, die weder im *C.albicans*- noch im *C.dubliniensis*-Wildtyp zu finden sind. Tatsächlich lieferte der durchgeführte phänotypische Arrey fünf Reaktionen, in denen CEM 8 ein von den beiden Wildtyp-Stämmen abweichendes Verhalten zeigte. So war dieser nicht in der Lage, L-Homocystein, n-Valerat, α -Ketoglutarat und Sebacidsäure zu verwerten. Außerdem fehlte CEM 8 die Aktivität der Leu-Gly-Aminopeptidase. Auch bei diesen Reaktionen kann man sich vorstellen, dass sie über eine Modifikation von Inhaltsstoffen des CHROMagars oder Beeinträchtigung von Stoffwechselprozessen an der Farbgebung beteiligt sind.

Zieht man nun wiederum in Betracht, dass der CHROMagar durch die pH-Neutralisierung gewissen Veränderungen unterliegt, könnte so die spezifische Färbung der Transformanten bei pH7 erklärt werden. Auch der leichte Violettstich, der nur die Transformanten nach verlängerter Inkubationsdauer auf Standard-CHROMagar auszeichnet, spricht für diese Erklärung.

Bezüglich des Wachstumsdefizits bei 45°C könnte die repressive Wirkung von Rim101 auf Gene verantwortlich sein, die für das Wachstum bei dieser Temperatur essentiell sind. Ist dieser repressive Effekt nicht zu stark ausgeprägt, reicht beim niedrigen *RIM101*-Expressionsniveau des *C.albicans*-Wildtyps die exprimierte Menge des relevanten Gens noch aus. Bei multiplen Kopien und bei *C.dubliniensis* ist die Repression dann aber so stark, dass das Wachstum bei 45°C beeinträchtigt wird.

4.1.5 Unterschiedliche Auswirkung der verstärkten *RIM101*-Expression auf das Filamentierungsverhalten von *C.albicans* und *C.dubliniensis*

Wildtypische *C.albicans*-Stämme mit ihrem geringen *RIM101*-Expressionsniveau benötigen neben einem neutralen bis alkalischen pH-Wert zusätzlich eine Temperatur von 37°C zur Keimschlauchinduktion. Doch während *C.albicans*-Transformanten schon ab vier *RIM101*-Kopien temperaturunabhängig filamentieren, benötigt *C.dubliniensis* trotz des generell erhöhten *RIM*-Expressionsniveaus weiterhin eine Temperatur von 37°C zur Filamentierung. Zwar haben wir die RNA für den Northern Blot bei 37°C isoliert und können somit nicht mit Sicherheit sagen, dass *C.dubliniensis*-*RIM101* auch bei niedrigeren Tem-

peraturen so stark exprimiert wird, doch ist bislang noch für keine Spezies ein Temperatureinfluss auf die *RIM101/PACC*-Expression beschrieben. Wir gehen also davon aus, dass auch bei 30°C *C.dubliniensis-RIM101* stärker exprimiert wird als das Homolog aus *C.albicans*, und darum der Grund für die fehlende Filamentierung bei niedrigen Temperaturen nicht in einer verminderten *RIM*-Expression zu suchen ist.

Um nun dieses Phänomen zu klären, ist es sinnvoll, vorher zu überlegen, wie bei *C.albicans* die multiplen *RIM101*-Kopien zu einer Umgehung der Temperaturrestriktion führen.

Möglich wäre ein Zusammentreffen von Temperatur- und pH-Signal auf einen gemeinsamen Effektor oder Regulator, dessen Induktion oder Aktivierung dann die Keimschlauchbildung in Gang setzt. Wirken dabei pH- und Temperatursignal additiv, so kann ein verstärktes pH-Signal, zum Beispiel durch multiple *RIM101*-Kopien, allein den gemeinsamen Regulator aktivieren. Sind hingegen beide Signale für die Aktivierung des Effektors notwendig, dann kann auch eine gesteigerte *RIM*-Expression das Temperatursignal nicht umgehen. Ein solcher Unterschied, additiver Effekt bei *C.albicans* und ergänzende Wirkung bei *C.dubliniensis*, könnte also diese Beobachtung erklären. Allerdings ist ein so großer Unterschied bei diesen extrem nahe verwandten Spezies doch eher unwahrscheinlich.

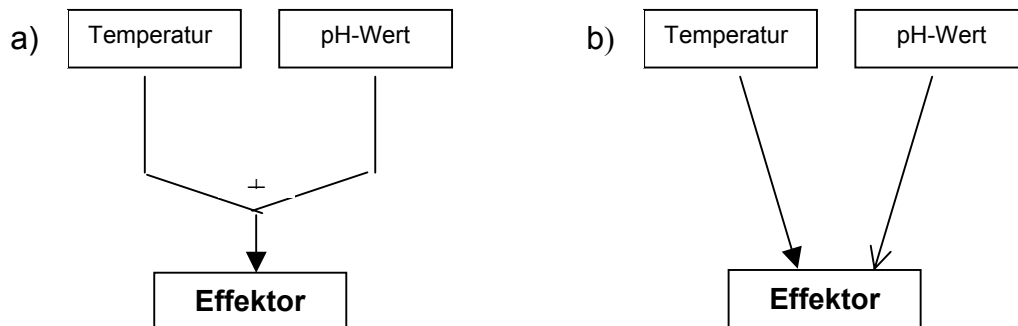


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der möglichen Übertragung von pH- und Temperatursignal auf einen gemeinsamen Effektor. a) additive Wirkung
b) ergänzende Wirkung

Eine weitere Möglichkeit wäre eine bei *C.dubliniensis* weniger effiziente Weiterleitung des pH-Signals, beispielsweise durch geringere Affinität oder schwächer induktive Wirkung von Rim101 auf den Promotor nachgeschalteter Gene, so dass für die Filamentierungsauslösung allein über Rim101 bei *C.dubliniensis* noch deutlich mehr aktiviertes Rim101 vorhanden sein müsste. Den umgekehrten Effekt, also einen stärker induktiven Effekt von *C.dubliniensis*-Rim101 auf bestimmte Promotoren, haben wir schon für die verstärkte

RIM101-Expression selbst bei *C.dubliniensis* diskutiert, und da hierfür wohl schon Punktmutationen im Bindungsbereich von Rim101 ausreichen, wie später für PacC erläutert, wäre diese Erklärung auch mit der Ähnlichkeit der beiden Spezies vereinbar.

Zum Dritten wäre auch hier ein breiteres Wirkungsspektrum von *C.albicans*-Rim101 eine Erklärungsmöglichkeit. Ist für die Filamentierung die Induktion verschiedener Gene notwendig, die bei *C.albicans* alle zumindest durch eine Überexpression von *RIM101* induzierbar sind, so ist hier kein zusätzliches Temperatursignal nötig. Reagieren aber einige dieser Gene bei *C.dubliniensis* nicht mehr auf Rim101 und sind nur über die Temperaturkaskade induzierbar, so ist keine Umgehung der Temperaturrestriktion möglich. Ursache für eine solche Einschränkung des Wirkungsspektrums könnten wiederum Punktmutationen der Rim101-Bindungsstellen im Promotor der entsprechenden Gene sein.

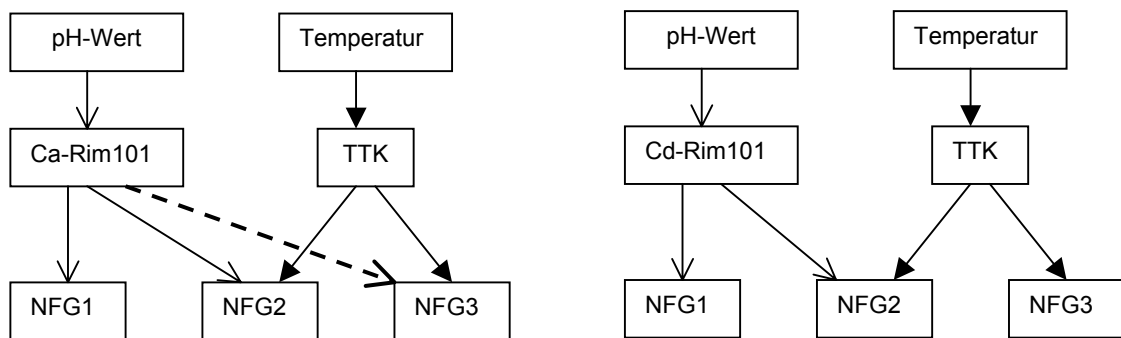


Abb. 4.2: Hypothetisches Schema: Temperaturunabhängige Filamentierung durch *RIM101*-Überexpression bei *C.albicans*, ermöglicht durch ein breiteres Wirkspektrum.

Ca-Rim101 kann bei Überexpression (unterbrochener Pfeil) auch NFG3 induzieren, bei *C.dubliniensis* wirkt *C.dubliniensis*-Rim101 nicht auf NFG3.

NFG: Notwendiges Filamentierungsgen **TTK:** Temperatur-Transduktions-Kaskade

Ein derartiger funktionsaufhebender Effekt einer Punktmutation ist für PacC von *A.nidulans* schon beschrieben, in dessen Bindungssequenz eine A₄ zu T Mutation ausreicht, um die Wirkung von PacC völlig aufzuheben (19). Auch Affinitätsabschwächungen sind durch Punktmutationen zu erzielen. So ermöglichen an Position 5 der Bindungssequenz zwar sowohl A als auch G eine Bindung von PacC, jedoch ist die Affinität zu GCCAAG deutlich größer als zu GCCAGG. Zusätzlich zu diesem Core-Hexamer haben auch die Basen an den Positionen -1 und +1 einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit. Die PacC-Bindungsstellen IpnA2 und IpnA3 im Promotor des Isopenicillin N-Synthetase-Gens von *A.nidulans* unterscheiden sich nur an diesen Stellen, mit T an -1 und A an +1 bei IpnA2 beziehungsweise G und C bei IpnA3, die Affinität zu IpnA2 ist jedoch fünfmal höher (19).

Zieht man nun auch die Ergebnisse des phänotypischen Arrays in Betracht, ergibt sich eine weitere Erklärungsmöglichkeit, die ebenfalls einen erweiterten Wirkungskreis des *RIM101*-Systems bei *C.albicans* zur Voraussetzung hat.

Wie bereits angedeutet, kann Filamentierung durch das additive Zusammenwirken bestimmter Temperatur- pH- und CO₂-Bedingungen sowie eines „chemischen Induktors“ ausgelöst werden. Wie Brown (6) darstellt, handelt es sich bei den „chemischen Induktoren“ meist um Stickstoffmangelbedingungen. Wir haben nun in Taxa Profile A vier N-haltige Verbindungen gefunden, die von CEM 8 im Gegensatz zu den beiden wildtypischen Stämmen nicht verwertet werden können. Ursache dafür kann eine nur bei *C.albicans* vorhandene repressive Wirkung von Rim101 auf die entsprechenden Stoffwechselprozesse sein. Damit wäre es möglich, dass CEM 8 auf bestimmten Medien im Vergleich zu den Wildtypen einem relativen Stickstoffmangel ausgesetzt ist, die chemischen Bedingungen bei CEM 8 also stärker filamentierungsinduzierend wirken und so schon bei der weniger optimalen Temperatur von 30°C Hyphenbildung induziert wird. Der *C.dublinois*- und *C.albicans*-Wildtyp hingegen sind in der Lage, ein größeres Repertoire an Stickstoffquellen zu nutzen, leiden also nicht unter Stickstoffmangel und benötigen somit zusätzlich das bei 37°C stärker filamentierungsinduzierend wirkende Temperatursignal.

4.2 Differentes Filamentierungsverhalten von *C.albicans* und *C.dublinois*

Bezüglich der pH-induzierten Filamentierung, die in den bisherigen Abschnitten diskutiert wurde, verhalten sich *C.albicans* und *C.dublinois* völlig identisch. Mit der Kombination von Kochblutagar und einem erhöhten CO₂-Gehalt der Inkubationsatmosphäre fanden wir aber Bedingungen, unter denen *C.dublinois*, abgesehen von wenigen Ausnahmen, weiterhin in der Hefeform wuchs, während alle untersuchten *C.albicans*-Stämme in eine filamentöse Wachstumsform übergingen. Damit existiert ein weiterer phänotypischer Unterschied zwischen den beiden so nahe verwandten Spezies, der zudem mit der Fähigkeit zu Filamentierung und invasivem Wachstum zwei wichtige Virulenzfaktoren betrifft.

4.2.1 Bedeutung der Inkubationsbedingungen für die differentielle Filamentierung

Für CO₂ ist schon seit Ende der 60er Jahre eine filamentierungsinduzierende Wirkung auf *C. albicans* bekannt. Mardon (41) zeigte 1969 an einer biochemischen Variante von *C. albicans*, die nur zur Pseudohyphenbildung fähig war, dass eine Erhöhung des CO₂-Anteils in der Inkubationsluft bis zu einem CO₂ zu O₂-Verhältnis von 2:1 die „Filamentierungsrate“ steigerte. Sims (75) und Mock (47) konnten diese Beobachtungen auch mit wildtypischen *C. albicans*-Stämmen reproduzieren.

Schon bald zeigte sich aber, dass CO₂-Erhöhung allein für das Auslösen der Filamentierung nicht ausreichend ist und vor allem der Stickstoffquelle zusätzlich eine große Bedeutung zukommt. So konnte Mardon (41) beispielsweise in Medien mit NH₄Cl, L-Glutamat und L-Prolin als N-Quelle das ursprüngliche Hefewachstum auch durch CO₂-Erhöhung nicht in filamentöses Wachstum umwandeln, und auch Sims (75) konnte nur in Kombination mit bestimmten Stickstoffquellen wie Asparaginsäure, Azetamid oder Rinderalbumin plus NH₄Cl durch CO₂ myzeliales Wachstum induzieren.

Auch in unserem Fall zeigte sich durch systematische Variation der Inkubationsbedingungen, dass erst das Zusammenspiel mehrerer Faktoren auslösend für die Filamentierung von *C. albicans* ist.

Da auf Sabouraud-Agar kein Effekt zu finden war, auf Blut- und Kochblutagar aber in steigendem Maße Filamentierung auftrat, scheinen diese beiden Medien eine Art chemischen Induktor zu enthalten, der im Blutagar jedoch in geringerer Konzentration oder einer weniger aktiven Form vorliegt. Möglich wären hier beispielsweise Unterschiede in der Zusammensetzung der Stickstoffquellen, wie sie oben schon näher beschrieben wurden. Denkbar wären auch unterschiedliche Induktoren in Blut- und Kochblutagar, von denen der im Kochblutagar wirksamer ist. Betrachtet man induktive Bedingungen nach der Definition von Brown (6) als Stress- oder Mangelbedingungen, so müssten dem Kochblutagar leicht zugängliche Nährstoffe, wiederum vor allem Stickstoffquellen, fehlen beziehungsweise Stoffe enthalten sein, die für *C. albicans* Stressfaktoren darstellen.

Zusammen mit diesen chemischen Bedingungen fördern in unseren Versuchen der erhöhte CO₂-Gehalt sowie eine Temperatur von 37°C die Keimschlauchbildung. Ein derartiger Temperatureffekt wurde unter anderem auch schon von Pollack (65) dargestellt, der zeigte, dass bei niedrigeren Temperaturen höhere Konzentrationen des Induktors notwendig sind, um Filamentierung auszulösen, und ab einer Temperatur unter 20°C keinerlei Filamentierung mehr zu finden ist. Auch Sims fand unter seinen Inkubationsbedingun-

gen bei 37°C schon bei atmosphärischem CO₂ vorwiegend myzeliales Wachstum, während bei 30°C erst nach Erhöhung des CO₂-Gehalts vermehrt Hyphenbildung auftrat.

Wie schon von diesen Autoren beobachtet ist es auch bei uns wieder erst das additive Zusammenwirken der Faktoren chemischer Induktor, Temperaturerhöhung und CO₂, das filamentöses Wachstum auslöst. Auf Kochblutagar mit CO₂ filamentieren 100% der von uns untersuchten *C.albicans*-Stämme. Bei den optimalen chemischen Induktionsbedingungen des Kochblutagars finden wir auch ohne CO₂ immer noch die gleiche Filamentierungsrate wie auf dem „weniger optimalen“ Blutagar mit CO₂. „Verschlechtern“ wir die Filamentierungsbedingungen noch weiter, indem wir Blutagar ohne CO₂ oder Kochblutagar ohne CO₂ bei 30°C verwenden, so sinkt die Filamentierungsrate noch deutlich weiter.

Unsere Ergebnisse bestätigen also eindeutig die Theorie eines Summationseffektes von filamentierungsauslösenden Bedingungen, wie er unter anderem von Sims (75) postuliert wurde. Die Frage nach den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen können wir aber trotzdem noch nicht beantworten. CO₂ als alleiniger gemeinsamer Mediator aller Faktoren, wie es vor allem von Mock (47) diskutiert wurde, scheint mir allerdings eher unwahrscheinlich, denn sonst müsste es möglich sein, allein durch eine Erhöhung des CO₂-Gehaltes auf allen Medien Filamentierung auszulösen. Dass dies aber nicht möglich ist, haben u.a. Mardon (41) und Sims (75) schon beschrieben. Sollte CO₂ also wirklich der gemeinsame Überträger aller filamentierungsinduzierenden Faktoren sein, so müsste zumindest ein zweiter Weg existieren, über den bestimmte Stoffe die Filamentierung unterdrücken können.

Wie oben schon dargelegt, löst Kochblutagar plus CO₂ bei *C.albicans* Filamentierung aus, während *C.dubliniensis* seine Morphologie nicht ändert. Ein solch differentes Verhalten war unter den bislang getesteten keimschlauchinduzierenden Bedingungen noch nicht aufgefallen. Bei neutralem pH-Wert und einer Temperatur von 37°C in M199 sowie auf Reis-Tween-Agar unter mikroaerophilen Bedingungen verlief die Keimschlauchbildung in unseren Versuchen bei *C.dubliniensis* zwar langsamer, erschien etwas reduziert und die Filamente blieben kürzer, doch war auch bei *C.dubliniensis* eindeutig Keimschlauchbildung und Filamentierung vorhanden. Auch in der Literatur ist eine verzögerte Keimschlauchbildung von *C.dubliniensis*, vor allem bei N-Acetyl-Glucosamin, als Induktionsfaktor beschrieben (24), doch ist dieser rein dynamische Effekt keinesfalls mit dem von uns beobachteten Effekt bei Inkubation auf Kochblutagar unter erhöhtem CO₂-Gehalt vergleichbar, wo *C.dubliniensis* qualitativ keinerlei Keimschlauchbildung zeigt.

Über den CO₂-Einfluss auf die Morphologie von *C.dublinsiensis* sind mir bislang noch keine Veröffentlichungen bekannt. Folgt man aber der Theorie von Sims (75) und interpretiert den Deckglaseffekt als Einfangen von CO₂ und betrachtet somit auch auf Reis-Tween-Agar einen erhöhten CO₂-Gehalt als filamentierungsauslösenden Faktor und nicht den reduzierten O₂-Gehalt, so wäre auch bei *C.dublinsiensis* eine filamentierungsinduzierende Wirkung von CO₂ gegeben.

4.2.2 Eignung als Testverfahren

Um die Verbreitung der jeweiligen Merkmalsausprägung innerhalb der beiden Spezies festzustellen, haben wir wie beschrieben 86 *C.albicans* und 48 *C.dublinsiensis*-Stämme auf Kochblutagar bei 5% CO₂ und 37°C gescreent. Alle *C.albicans*-Stämme bildeten Ausläufer. Unter den *C.dublinsiensis*-Stämmen zeigten 46 völlig glatte Kolonien, die zwei übrigen bildeten dezente Ausläufer. In unserer Versuchsreihe zeigten also 100% der *C.albicans*-Stämme und 95,8% der *C.dublinsiensis*-Stämme den jeweils „charakteristischen“ Phänotyp. 4,2% der *C.dublinsiensis*-Stämme zeigten allerdings eine Merkmalsausprägung, die eher dem *C.albicans*-Phänotyp entsprach. Das entspricht aber immerhin noch einer Quote von 98,5% richtiger Speziesidentifizierung.

Will man nun die Eignung dieses Verfahrens zur phänotypischen Speziesdiagnostik beurteilen, müssen einige Vergleichsgrößen beachtet werden.

Bezüglich der Identifizierung von *C.dublinsiensis* liegt die Sensitivität, also das Verhältnis der erkannten *C.dublinsiensis*-Stämme zur Gesamtzahl dieser Stämme, bei 95,8%. Die Spezifität und damit die Fähigkeit des Testes, ausschliesslich *C.dublinsiensis*-Stämme als solche zu identifizieren, liegt bei 100%.

Für die Diagnose von *C.albicans* ergibt sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 95,8%.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den von Kurzai (33) und Tintelnot (85) gewonnenen Daten bezüglich der Eignung schon bekannter phänotypischer Testverfahren zur Differenzierung von *C.dublinsiensis* gegenüber *C.albicans*, so schneidet diese neue Methode recht gut ab.

Für CHROMagar ergab sich eine Sensitivität von 57% bei Tintelnot und 81% bei Kurzai, bei einer Spezifität von 84%.

Das Chlamydosporenmuster auf Reis-Tween-Agar erzielte eine Sensitivität von 87% respektive 57% und eine Spezifität von 75% beziehungsweise 77%.

Bei 42°C in den Untersuchungen von Tintelnot beziehungsweise 45°C bei Kurzai zeigten jeweils 100% der *C.dubliniensis*-Stämme ein Wachstumsdefizit, die Spezifität lag bei 96% und 84%.

Auf Staibagar, der hier nur von O. Kurzai getestet wurde, bot sich sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von 100%. Die Zahlen von Al Mosaid, der ebenfalls den Staibagar evaluierte, sind zwar nicht ganz so gut, doch auch er fand eine Sensitivität von 97,7% für die Filamentierung und 85,4% für die Chlamydosporenbildung bei einer Spezifität von 100%.

Somit zeigt nur der Staibagar und das 42°C-Wachstum bei Tintelnot vergleichbare oder bessere Ergebnisse wie unsere Testung auf Kochblutagar unter erhöhtem CO₂-Gehalt. (vgl. Abb. 4.4)

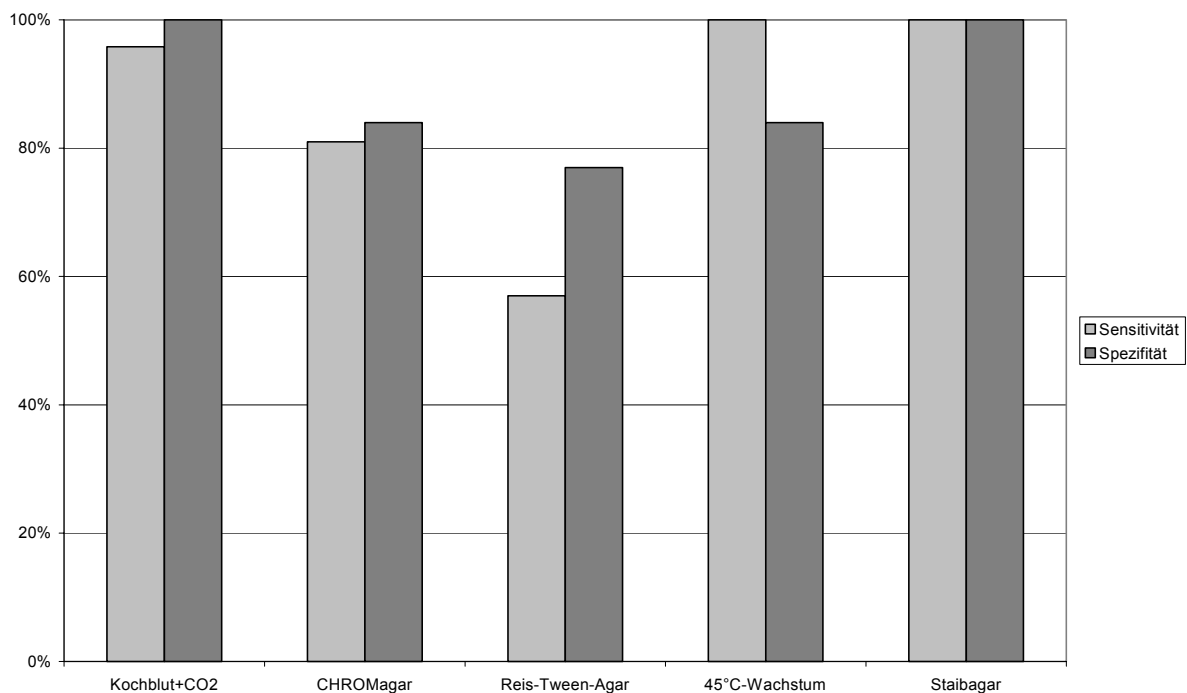


Abb. 4.4 Eignung verschiedener Testverfahren zur Differenzierung zwischen *C.dubliniensis* und *C.albicans*.
Daten zu CHROMagar, Reis-Tween-Agar, 45°C-Wachstum und Staibagar gemäss O. Kurzai (33)

Die bisher genannten Zahlen beziehen sich allerdings nur auf eine Unterscheidung zwischen *C.albicans* und *C.dubliniensis*, andere *Candida*-Spezies wurden nicht berücksichtigt. Beim Screening haben wir jedoch auch drei *C.tropicalis*-, einen *C.glabrata*- und einen *S.cerevisiae*-Stamm mitgetestet. Die beiden letzteren wuchsen in Form glatter Kolonien, wie sie auch für *C.dubliniensis* typisch sind. Von den drei *C.tropicalis*-Stämmen bildete einer in vergleichbarem Maße Ausläufer wie *C.albicans*, die beiden anderen zeigten ebenfalls glatte Kolonien. Zwar sind die Zahlen hier viel zu gering, um allgemeingültige

Aussagen zu machen, doch scheint zumindest die Merkmalsausprägung von *C.dubliniensis* nicht speziesspezifisch zu sein. Eher könnte die Bildung von Ausläufern einen Hinweis in Richtung *C.albicans* geben, aber auch hier ist keine sichere Aussage möglich, da schon bei den drei untersuchten *C.tropicalis*-Stämmen einer die *C.albicans*-typischen Merkmale zeigt, woraus sich natürlich noch keine Aussage über die generelle Häufigkeit dieses Merkmals bei *C.tropicalis* ableiten lässt.

4.2.3 Bedeutung für die Pathogenitätsforschung

Obwohl dieses Verfahren bezüglich der untersuchten Testkriterien überzeugende Ergebnisse liefert, sehen wir seine eigentliche Bedeutung in der Klärung möglicher Ursachen für die deutlichen Virulenzunterschiede von *C.albicans* und *C.dubliniensis*

Candida-Spezies insgesamt liegen heute an vierter Stelle unter den Blutkulturisolaten hospitalisierter Patienten (16), Tendenz steigend. Doch während *C.albicans* mit durchschnittlich 55% (16, 60) weiterhin mit Abstand die am häufigsten isolierte Spezies ist und mit einer Mortalität von etwa 40% (16) zu den gefährlichsten Sepsiserregern zählt, wurden bislang weltweit nur sieben Fälle beschrieben, bei denen *C.dubliniensis* aus der Blutkultur von Sepsispatienten isoliert wurde (4, 44). Zudem kann auch bei diesen Fällen *C.dubliniensis* nicht mit Sicherheit als Verursacher der Symptomatik angesehen werden, da in fünf Fällen vor Entnahme der Blutkulturen eine Antibiotikatherapie erfolgte und in drei dieser Fälle zudem Mischinfektionen vorlagen. In den beiden Fällen ohne vorhergehende Antibiotikatherapie lässt sich die klinische Symptomatik gut durch die schweren Grund- und Begleiterkrankungen erklären, an denen die Patienten dann auch verstarben. So haben wir auf der einen Seite den weitverbreiteten, gefährlichen Sepsiserreger *C.albicans* und auf der anderen Seite *C.dubliniensis*, der praktisch nur als Soorerreger bei HIV-Patienten eine Rolle spielt.

Auch im Tiermodell wird dieser Virulenzunterschied deutlich. Bei systemischer Infektion von Mäusen einerseits mit *C.albicans* 3153 und andererseits mit vier verschiedenen *C.dubliniensis*-Stämmen, war die Überlebenszeit bei einer Infektionsdosis von 2×10^6 Zellen pro Maus bei drei der *C.dubliniensis*-Stämme doppelt so lange wie bei *C.albicans*. Auch der vierte *C.dubliniensis*-Stamm zeigte eine geringere Virulenz als *C.albicans* 3153. Aufgrund der geringen Fallzahlen reichte dieser Unterschied aber für eine statistische Signifikanz nicht aus (24).

Das alles spricht dafür, dass *C.albicans* zumindest unter den Bedingungen, die im Blut herrschen, gegenüber *C.dubliniensis* einen Virulenzvorsprung hat.

Ein schon bekannter und nachgewiesenermaßen wichtiger Virulenzfaktor ist die Fähigkeit zu filamentieren und invasiv zu wachsen. *C.albicans*-Mutanten ohne diese Fähigkeiten sind im Mausmodell einer systemischen Infektion praktisch avirulent (38). Genau das ist es aber, was wir in unserem Experiment bei *C.dubliniensis* mit seinem reinen Hefewachstum gefunden haben, während *C.albicans* filamentös und invasiv wächst. Natürlich handelte es sich um „in vitro“-Bedingungen, trotzdem bietet sich hier möglicherweise ein Ansatzpunkt, um den starken Virulenzunterschieden der beiden Spezies auf den Grund zu gehen.

Zunächst müssen die Faktoren identifiziert werden, die auf molekularer Ebene für die Filamentierung unter unseren speziellen Bedingungen verantwortlich sind.

Zwei Transkriptionsfaktoren, Efg1 und Cph1, sind bezüglich ihrer Stellung in der Filamentierungsregulation schon sehr gut charakterisiert. Sie agieren jeweils am Ende zweier unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden und wirken beide positiv auf die Filamentierung.

Cph1 ist das Endglied einer MAPkinase-Kaskade, die in ähnlicher Form auch in *S.cerevisiae* vorkommt. *Cph1*-Nullmutanten zeigen nur auf einigen soliden Medien defekte Hyphenbildung, die Virulenz ist nicht herabgesetzt.

Efg1 gehört wie StuA von *A.nidulans* und Phd1 sowie Sok1 von *S.cerevisiae* zu einer relativ neu entdeckten Gruppe von Transkriptionsregulatoren, die alle an Zelldifferenzierungsprozessen bei Pilzen beteiligt sind. Efg1 steht am Ende einer cAMP-regulierten Signaltransduktionskaskade. *Efg1*-Deletionsmutanten bilden unter fast allen filamentierungsinduzierenden Bedingungen zwar vermehrt Pseudohyphen, jedoch keine echten Myzelien. Ihre Virulenz ist deutlich abgeschwächt.

In *cph1-efg1*-Doppelnulmutanten findet sich nur unter wenigen speziellen Induktionsbedingungen noch eine schwache Keimschlauchbildung. Sie sind nicht mehr in der Lage, aus Makrophagen zu evahieren und sind im Mausmodell praktisch avirulent.

Die filamentierungsinduzierende Wirkung von Rim101 ist abhängig von Efg1. Sind beide Teil einer Kaskade, so liegt Efg1 sicher stromabwärts von Rim101, da Mutanten mit konstitutiv aktivem Rim101 *efg1*-Nullmutationen nicht umgehen können.

Weiterhin ist mit Tup1 auch ein Transkriptionsrepressor an der Filamentierungsregulation beteiligt. Tup1 selbst besitzt keine DNA-Bindfähigkeit und ist an der Regulation verschiedenster Zellstoffwechselprozesse beteiligt. Seine jeweilige Spezifität erlangt es erst im Komplex mit einem Trägerprotein, das die selektive DNA-Bindung vermittelt. Im Falle

der Filamentierungsgene übernimmt Rfg1 diese Rolle. *Tup1*- und *rfg1*-Nullmutanten zeigen konstitutiv filamentöses Wachstum, das aber auch unter nichtinduktiven Bedingungen großteils von Efg1 abhängig ist, wie es die deutlich eingeschränkte Filamentierung von Doppelnullmutanten beweist.

Neben diesen bekannten Transkriptionsfaktoren werden in letzter Zeit immer mehr Proteine identifiziert, die ebenfalls den Morphologiewechsel von *C. albicans* beeinflussen. Ihre genaue Zuordnung zu einzelnen Transduktionskaskaden ist jedoch meist noch nicht möglich.

Sicher erscheint jedoch die Existenz wenigstens eines weiteren filamentierungsinduzierenden Pfades, unabhängig von Efg1 und Cph1. Dieser ist notwendig, um die von Braun (5) gefundene umweltinduzierbare, jedoch von Cph1 und Efg1 völlig unabhängige Expression des hyphenspezifisch regulierten Genes *RBT5* zu erklären.

Bei unserer Testung der *efg1*-, *cph1*- und *rim101*-Deletionsmutanten zeigte nur die *efg1/cph1*-Doppelnullmutante keine Ausläufer. Somit scheinen sowohl Efg1 als auch Cph1 an der Filamentierungsauslösung beteiligt zu sein. Efg1 kommt jedoch die größere Bedeutung zu, da nur die singuläre *efg1*-Knockout-Mutante sich durch ihre glatte Kolonieoberfläche eindeutig von den rauen Wildtyp-Kolonien unterscheidet.

Eine Beteiligung von Rim101 an der Merkmalsausprägung ist ebenfalls möglich, da die Bedeutung von Cph1 auch erst in der Doppelmutante sichtbar wurde.

Wie in Bezug auf die auslösenden Signale spielen also auch bei der Signalumsetzung verschiedene Faktoren eine Rolle, so dass eine getrennte Verarbeitung der einzelnen Signale CO₂, Temperatur und chemischer Induktor durchaus denkbar wäre. Für die „Outputs“ ist eine solch strikte Trennung der einzelnen Transduktionskaskaden aber nicht gegeben. Dafür spricht, dass auch in singulären Deletionsmutanten der Efg1- oder Cph1-Kaskade durch eine verminderte Zahl von Induktionsbedingungen immer noch reguläre Filamentierung ausgelöst werden kann. Auch das additive Zusammenwirken der einzelnen Induktionsfaktoren setzt eine Vernetzung der Kaskaden voraus, sonst könnte beispielsweise eine CO₂-Erhöhung nicht einen ungünstigen Temperatureffekt ausgleichen.

Eine Alternative wäre das völlige Fehlen filamentierungsessentieller Gene. Verfügt jeder einzelne Pfad über den kompletten Gensatz, der für die Filamentierung notwendig ist, so muss keinerlei Vernetzung zwischen den Pfaden vorliegen.

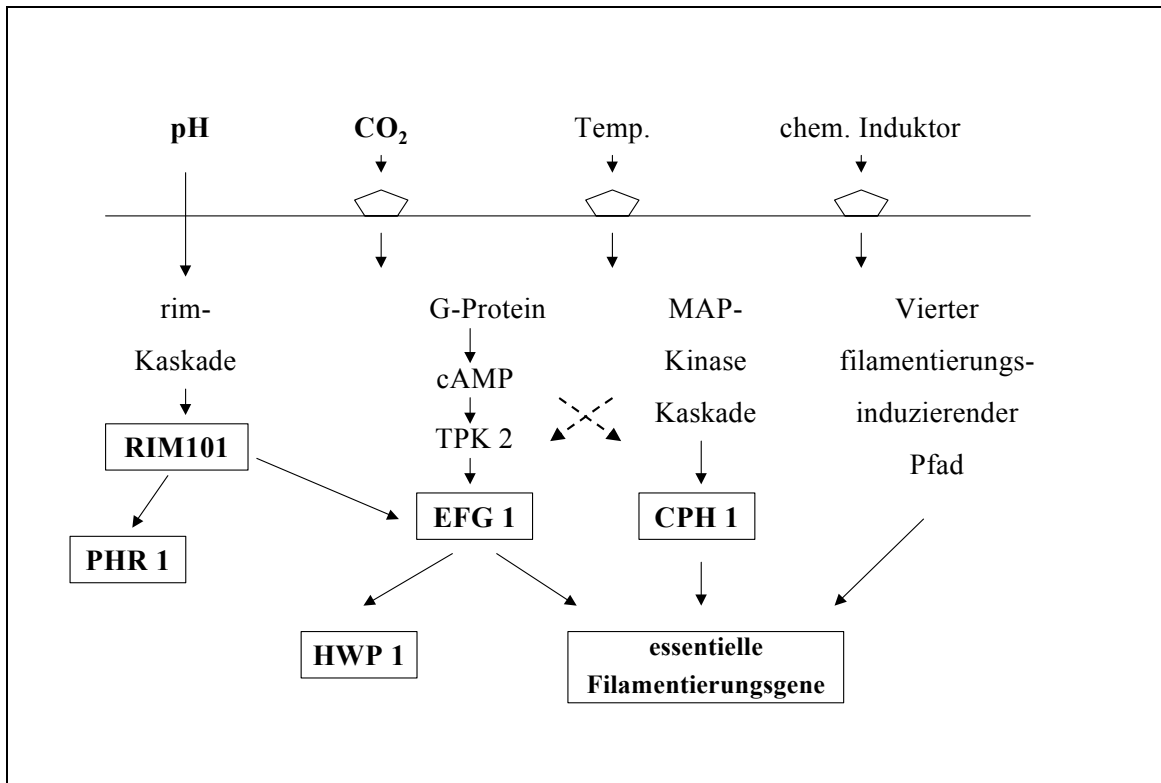


Abb. 4.5 Potentielle Filamentierungskaskade

Da wir nun bei *C.dubliniensis* im Gegensatz zu *C.albicans* in unseren Versuchen keine Keimschlauchbildung beobachteten, muß auf irgendeinem Niveau des Filamentierungsweges ein Unterschied zwischen diesen beiden Spezies bestehen. Seine Lokalisation im Endbereich der Kaskaden ist eher unwahrscheinlich, da bezüglich der meisten Induktionsbedingungen keine Differenzen bestehen. Wahrscheinlicher erscheint mir dieser auf Höhe der Signalperzeption oder der primären Signaltransduktion zu liegen, so dass bei *C.dubliniensis* bestimmte Faktoren nicht in der Lage sind, die Filamentierungskaskade in Gang zu setzen.

Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt noch einmal die Ergebnisse des phänotypischen Arreys, so fällt in Taxa profile A die bei *C.dubliniensis* fehlende Verwertung von Glycin auf, einer Aminosäure, die nach den Ergebnissen von Mardon (41) filamentöses Wachstum induzieren kann. Folgt man nun der Theorie von Pollack (65) und Hashimoto, die eine Metabolisierung des Induktors für nötig erachten, so könnte beispielsweise Glycin ein solcher Faktor sein.

Zu klären ist auch noch, welcher „Induktor“ im Kochblut neben CO_2 und erhöhter Temperatur die Filamentierung bei *C.albicans* auslöst.

Dann kann man ganz spezifisch unter diesen Bedingungen RNA von *C.albicans* und *C.dubliniensis* isolieren, nach Unterschieden in den Genexpressionsmustern suchen und damit eventuell Gene identifizieren, die für die Virulenz von *C.albicans* entscheidend sind. Dabei könnten auch die beiden filamentierenden *C.dubliniensis*-Stämme nützlich sein, um nicht filamentierungsrelevante speziesspezifische Unterschiede zu erkennen.

In weiterer Zukunft könnte dann eine pharmazeutische Blockade dieser Virulenzgene von *C.albicans* auch in der Therapie und vor allem Prophylaxe bei Risikopatienten zur Anwendung kommen.

5. Zusammenfassung

Auch bei der Regulation des pH-abhängigen Dimorphismus von *C.dubliniensis* spielt der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *RIM101* eine zentrale Rolle. Dieser weist mit 85% zwar eine im Speziesvergleich geringe Aminosäureidentität zu *C.albicans*-Rim101 auf, zeigt jedoch die gleiche pH-abhängige Expression wie *C.albicans*-*RIM101*, ist in *C.albicans* funktionell aktiv und kann die typischen Defekte einer *C.albicans*-*rim101*-Nullmutante komplementieren. *C.dubliniensis*-Rim101 ist zudem beteiligt an der Regulation des Wachstums bei 45°C und der Koloniefärbung auf CHROMagar-Candida, zwei Eigenschaften, in denen sich *C.albicans* und *C.dubliniensis* unterscheiden. Ursache für diese speziesspezifische Merkmalsausprägung ist die bei *C.dubliniensis* deutlich stärkere Expression von *RIM101*.

Ein weiterer phänotypischer Unterschied zwischen *C.albicans* und *C.dubliniensis* betrifft mit der Fähigkeit zu Filamentierung und invasivem Wachstum zwei für *C.albicans* nachgewiesenermaßen wichtige Virulenzfaktoren. Auf Kochblutagar, nach 24 - 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, bildet *C.dubliniensis* glatte, weiß-glänzende, scharf begrenzte halbkugelförmige Kolonien, während *C.albicans*-Kolonien eine rauhe, grau erscheinende Oberfläche aufweisen und mit Ausläufern in den umgebenden Agar einwachsen. Auslösend für die ausgeprägte Filamentierung von *C.albicans* ist das additive Zusammenwirken von erhöhtem CO₂-Gehalt, erhöhter Temperatur und einem noch nicht endgültig identifizierten Bestandteil des Kochblutagars.

Mit einer Sensitivität von 95,8% und einer Spezifität von 100% eignet sich dieses Verfahren auch als einfacher diagnostischer Test.

Auf molekularer Ebene sind Efg1 und Cph1 an der Filamentierungsauslösung beteiligt, wobei Efg1 aber eine wesentlich größere Bedeutung zukommt. Rim101 scheint keinen Einfluss zu haben.

Tab. 6.1 Ergebnisse des phänotypischen Array mit SC 5314, CBS 7987 als Referenzstämmen sowie CEM 8

In der zweiten Spalte findet sich das jeweilige Substrat, in Spalte drei die zugehörige Abkürzung. In den folgenden drei Spalten ist bei den drei Teststämmen eine nachweisbare Reaktion jeweils mit einem Kreuz markiert.

a) Taxa profile C

no.	carbohydrates agents	abb.	C.a.	CEM 8	C.d.
1	(s)-(-)-glycidol	GLYOL			
2	dl-a-glycerophosphate	aGLYP			
3	d(-)-erythrose	ERO			
4	l-erythrulose	ERU			
5	l(+)-threose	THREO			
6	i-erythritol	EROL			
7	l-threitol	L-TOL			
8	d-threitol	D-TOL			
9	d(-)arabinose	D-ARA			
10	l(+)-arabinose	L-ARA			
11	l-lyxose	L-LYX			
12	d-lyxose	D-LYX	x	x	x
13	d-ribulose	RIBU			
14	l(+)-ribose	L-RIB			
15	d(-)-ribose	D-RIB			
16	l(-)-xylose	L-XYL			
17	d(+)-xylose	D-XYL	x	x	x
18	l(-)arabitol	L-AOL			
19	d(+)-arabitol	D-AOL	x	x	x
20	adonit	ADON	x	x	x
21	xylitol	XYTOL	x	x	x
22	d-ribose-5-phosphate	RIBOP	x	x	x
23	d-ribonic acid	RIBOS			
24	2-deoxy-d-ribose	DORIB			
25	d(-)-lyxosylamine	LYXA			
26	methyl-d-xylopyranoside	MdXYL			
27	methyl β -d arabinopyranoside	M β ARA			
28	methyl β -l-arabinopyranoside	M β LAR			
29	methyl- β -d-xylopyranoside	M β XYL			
30	a-chloralose- β -anomer	CHLA			
31	2,3-o-isopropylidene- β -d-ribofuranosylam. p-toluensulfonat	IPRAS			
32	β -d-allose	D-ALL			
33	d(-)-fructose	D-FRU	x	x	x
34	d(+)-galactose	D-GAL	x	x	x
35	d(+)-glucose	D-GLU	x	x	x
36	l(-)-mannose	L-MAN			
37	d(+)-mannose	D-MAN	x	x	x
38	d-psiocose	D-PSI			
39	l(-)-sorbitose	L-SOR			
40	d(+)-sorbitose	D-SOR	x	x	x
41	l(-)-talose	L-TAL			
42	a-d-talose	D-TAL			
43	d-tagatose	D-TAG			
44	d(+)-digitoxose	DIGTO			
45	myo-inositol	INOL			
46	1-deoxy-1-nitro-d-sorbitol	DNSOL			
47	1-deoxy-1-nitro-d-mannitol	DNMOL			
48	1-deoxy-1-nitro-d-altritol	DNAOL			
49	l-fucitol	FUCOL			
50	dulcitol	DULOL			
51	l-iditol	IDOL			
52	d-mannitol	MANOL	x	x	x
53	d-sorbitol	SOROL	x	x	x
54	1,6-anhydro- β -d-galactopyranose	AHGAL			

55	1,6-anhydro- β -d-mannopyranose	AHMAN			
56	1,6-anhydro- β -d-glucose	AHGLU			
57	d-fructose-6-phosphate	FRUGP	x	x	x
58	2-deoxy-d-galactose	DOGAL			
59	2-deoxy-d-glucose	DOGLU			
60	2-deoxy-d-ribo-hexopyranose	DIRIH			
61	l(-)-fucose	L-FUC			
62	d(+)-fucose (6-deoxy-D-galactose)	D-FUC			
63	methyl-a-d-mannopyranoside	MaMAN			
64	a-l-rhamnose (6-deoxy-l-mannose)	L-RHA			
65	methyl-a-l-rhamnopyranoside	MaRHA			
66	methyl- β -d-galactopyranoside	M β GAL			
67	methyl- β -d-glucopyranoside	M β GLU			
68	6-o-methyl-d-galactopyranose	MEGAL			
69	methyl-a-d-galactopyranoside	MaGAL			
70	3-o-methyl-d-glucopyranose	MEGLU			
71	methyl a-d-glucopyranoside	MaGLU	x	x	-
72	1,2-o-isopropylidene-a-d-glucofuranoside	PGF			
73	d-glucose-l-cysteine	GLUCY	x	x	x
74	d-galactonic acid	GALAS			
75	d-gluconic acid	GLOS			
76	6-phosphogluconic acid	PGCHA			
77	l-ascorbic acid	ASCOS			
78	2-keto-d-gluconic acid	2KGS	x	x	x
79	5-keto-d-gluconic acid	5KGS			
80	d-glucuronic acid	GLUS			
81	d-saccharic acid	SAAS			
82	d-galacturonic acid	GALS			
83	d-isoascorbic acid	ASBS			
84	muramic acid	MURS			
85	d(-)-pantoyllactone	PANTI			
86	d-galactonic acid γ -lactone	GALL			
87	d-gulono- γ -lactone	GULL			
88	d-glycoheptono-1,4-lactone	GLYHL			
89	l-gulono- γ -lactone	GULOL			
90	l-galactonic acid- γ -lactone	GALOL			
91	d-gluconic acid lactone	GLUSL			
92	l-mannonic acid γ -lactone	MANSL			
93	d-glucuronic acid lactone	GLOSL			
94	d-saccharic acid 1,4-lactone	SAS1L			
95	D-saccharic acid 3,6-lactone	SAS3L			
96	d(+)-galactosamine	GALA			
97	d(+)-glucosamine	GLA	x	x	x
98	d-mannosamine	MANA			
99	n-acetyl-d-galactosamine	AGALA			
100	n-acetyl-d-mannosamine	AMANA			
101	n-acetyl-d-glucosamine	AGLA	x	x	x
102	sedoheptulose	SEDHU			
103	d-glucoheptose	GLUHO			
104	d-mannoheptose	MANHO			
105	a-d-glucoheptonic acid	GLUHS			
106	n-methyl-d-glucamine	MGLCA			
107	cytidine	CYTID			
108	inosine 5'-monophosphate	INOP			
109	inosine	INON			
110	xanthosine	XANTH			
111	dl-a-o-benzylglycerol	BGLOL			
112	β -gentiobiose	β -GEN			
113	isomaltose	MALTO	x	x	x
114	maltose	MATS	x	x	x
115	β -lactose	β -LAC			
116	a-lactose	a-LAC			
117	lactulose	LACTU			
118	melibiose	MELI			
119	palatinose	PAL	x	x	x
120	sucrose	SUCR	x	x	x
121	d(+)-trehalose	TREH	x	x	x
122	cellobiose	CELOB			

123	turanose	TURA	x	x	x
124	d(+)-melezitose	MLZT			
125	maltotriose	MALTR	x	x	x
126	1-thio- β -d-galactopyranoside	THGAL	x	x	x
127	d-amygdalin	AMY	x	x	x
128	naringin	NAR	x	x	x
129	8-hydroxyquinoline- β -d-glucopyranoside	HQGLU			
130	n-nonyl- β -d-glucopyranoside	N β GLU			
131	fraxin	FRAX			
132	methyl 2,3-o-isopropylidene-a-d-mannopyranoside	MIPM			
133	1,2:3,5-di-o-isopropylidene-d-xylofuranoside	IPXF			
134	3-o- β -d-galactopyranosyl-d-arabinose	GALAR			
135	arbutin	ARBU			
136	p-aminophenyl β -d-galactopyranoside	A β GAL			
137	salicin	SAL			
138	1,2:5,6-di-o-isopropylidene-a-d-glucofuranoside	IPGF			
139	1,2:5,6-di-o-isopropylidene-a-d-allofuranoside	IPAF			
140	1,2:4,5-di-o-isopropylidene- β -d-fructopyranoside	IPFP			
141	1,2:3,4-di-o-isopropylidene-d-galactopyranoside	IPGP			
142	2,3:4,6-di-o-isopropylidene-a-l-sorbofuranoside	IPSF			
143	2,3:5,6-di-o-isopropylidene-a-d-mannofuranoside	IPMF			
144	1,2:5,6-di-o-isopropylidene-d-mannitol	IPMOL			
145	maltitol	MALOL	x	x	x
146	lactobionic acid	LABIS			
147	melibionic acid	MEBIS			
148	n-benzoyl-d-glucosamine	BGLA			
149	β -d-glucosamine	GLAPA			
150	panose	PAN	x	x	x
151	d(+)-raffinose	RAFI			
152	arabinogalactan	ARGAL			
153	α -cyclodextrin	α -CYD			
154	β -cyclodextrin	β -CYD			
155	γ -cyclodextrin	γ -CYD			
156	Hydroxylpropyl- β -Cyclodextrin	H β -CYD			
157	heptakis(2,6-di-o-methyl)- β -cyclodextrin	DMCYD			
158	heptakis(2,3,6-tri-o-methyl)- β -cyclodextrin	TMCYD			
159	gum tragacanth	GUMTA			
160	gum karaya	GUMKA			
161	gum xanthan	GUMXA			
162	gum arabic	GUMA			
163	Gellan Gum	GEGUM			
164	mucin typ III	MUCIN			
165	pullulan	PULL			
166	stachyose	STACH			
167	amylopectin	AMPEC			
168	chitosan	CHI			
169	carboxymethylamylose	CMAMY			
170	carboxymethylcellulose	CMCEL			
171	dextran	DEX			
172	ficoll typ 70	FCLL			
173	fucoidan	FUCD			
174	glycogen typ VII	GLYCO			
175	β -glucan	β GLUC			
176	glycol chitosan	GCCHI			
177	hydroxyethyl starch	HESTA			
178	hydroxypropylmethylcellulose	HMCEL			
179	inulin	INULD			
180	lichenan	LICH			
181	levan	LEV			
182	methylglycol chitosan	MGCHI			
183	4-o-methyl-d-glucurono-d-xylan	MGXYN			
184	methyl cellulose	MECEL			
185	pectin	PEC			
186	arabic acid	ARBS			
187	starch	STA			
188	xylan	XYN			
189	colominic acid	COLMS			
190	polygalacturonic acid	PGALS			

191	hyaluronic acid	HYLS			
192	growth control	ACO			

b) Taxa profile A

no.	amino acids/organic acids agents	abb.	C.a.	CEM 8	C.d.
1	glycine	Gly	x	x	-
2	β-alanine	β-Ala	x	x	x
3	l-alanine	L-Ala	x	x	x
4	d-alanine	D-Ala	x	x	x
5	l-valine	L-Val			
6	d-valine	D-Val			
7	l-leucine	L-Leu			
8	d-leucine	D-Leu			
9	l-isoleucine	L-Ile			
10	d-isoleucine	D-Ile			
11	l-proline	L-Pro	x	x	x
12	d-proline	D-Pro	x	x	x
13	l-phenylalanine	L-Phe			
14	d-phenylalanine	D-Phe			
15	l-tryptophan	L-Trp			
16	d-tryptophan	D-Trp			
17	l-methionine	L-Met			
18	d-methionine	D-Met			
19	l-serine	L-Ser	x	x	x
20	d-serine	D-Ser			
21	l-threonine	L-Thr			
22	d-threonine	D-Thr			
23	l-cysteine	L-Cys			
24	d-cysteine	D-Cys			
25	l-tyrosine	L-Tyr	x	x	x
26	d-tyrosine	D-Tyr	x	x	x
27	l-asparagine	L-Asn	x	x	x
28	d-asparagine	D-Asn			
29	l-glutamine	L-Gln	x	x	x
30	d-glutamine	D-Gln			
31	l-aspartic acid	L-Asp	x	x	x
32	d-aspartic acid	D-Asp			
33	l-glutamic acid	L-Glu			
34	d-glutamic acid	D-Glu			
35	l-lysine	L-Lys			
36	d-lysine	D-Lys			
37	l-arginine	L-Arg			
38	d-arginine	D-Arg			
39	l-histidine	L-His			
40	d-histidine	D-His			
41	l-norvaline	L-NVal			
42	d-norvaline	D-NVal			
43	l-norleucine	L-NLeu			
44	d-norleucine	D-NLeu			
45	L-homoserine	L-HSer			
46	d-homoserine	D-HSer			
47	l-homoarginine	L-HArg			
48	dl-homocysteine	dlHCys			
49	n-acetyl-l-leucine	AcLeu			
50	na-acetyl-l-arginine	AcArg			
51	n-acetyl-dl-glutamic acid	AcGlu			
52	n-acetyl-l-aspartic acid	AcAsp			
53	cycloleucine	CLeu			
54	d-cycloserine	DCSer			
55	hippuric acid	Hip			
56	p-aminohippuric acid	pAHip			
57	trans-4-hydroxy-l-proline	tHPro			
58	l-cystine	L-Cyss			
59	l-cysteic acid	L-Cysa			
60	l-homocystine	LHCyss	x	-	x
61	l-pyroglutamic acid	L-Pyrg			
62	d-pyroglutamic acid	D-Pyrg			

63	l-ornithine	L-Orn	x	x	x
64	d-ornithine	D-Orn			
65	l-citrulline	L-Cit			
66	l-carnosine	L-Caro			
67	l-carnitine	L-Carn			
68	d-carnitine	D-Carn			
69	dl-a,e-diaminopimelic acid	diAPim			
70	dl-a-aminopimelic acid	APim			
71	creatine	Creat			
72	cadaverine	Cadav	x	x	-
73	putrescine	Putre	x	x	-
74	spermine	Sperm			
75	spermidine	Sperd			
76	hippuryl-arg	HipArg			
77	ala-gln	AlaGln			
78	ala-gly	AlaGly			
79	glutathione	Gluth			
80	l-a-amino-n-butyric acid	LABut			
81	d-a-amino-butyric acid	DABut			
82	dl-β-amino-n-butyric acid	βABut			
83	g-amino-n-butyric acid	gABut	x	x	x
84	γ-guanidinobutyric acid	γGBut	x	x	-
85	5-aminolevulinic acid	5ALec			
86	l-alaninamide	LAlaA			
87	l-leucinamide	LLeuA			
88	l-prolinamide	L-ProA			
89	l-tyrosinamide	LTyrA			
90	p-aminocinnamic acid	pACin			
91	acetamide	AcetA			
92	betaine	Betai			
93	sarcosine	Sarc			
94	allantoin	Allat			
95	guanidoacetic acid	GuaA			
96	guanidinosuccinic acid	GuaSu			
97	dl-a-aminoadipic acid	aAAdi			
98	dl-a-amino-ε-caprolactam	ACapr			
99	trigonelline	Trigo			
100	tyramine	Tyram			
101	dl-kynurenine	DLKyn			
102	kynurenic acid	KynA			
103	taurine	Taur			
104	ethanolamin	Etha			
105	acetate	Acet	x	x	x
106	thioglycolic acid	Thio			
107	glycolic acid	Glyc			
108	glyoxylic acid	Glyx			
109	oxalic acid	Oxal			
110	propionic acid	Propl			
111	malonic acid	Malo			
112	pyruvic acid	Pyru	x	x	x
113	propionic acid	Propn	x	x	x
114	dl-lactic acid	DLLac	x	x	x
115	fumaric acid	Fuma	x	x	x
116	maleic acid	Male			
117	succinic acid	Succa	x	x	x
118	oxalacetic acid	Oxala	x	?	
119	d(-)-tartaric acid	DTart			
120	crotonic acid	Crot	x	x	x
121	d(+)-malic acid	Mali			
122	γ-hydroxybutyric acid	γHBut			
123	dl-β-hydroxybutyric acid	βHBut			
124	isobutyric acid	iBut			
125	α-hydroxyisobutyric acid	αHiBu			
126	isovaleric acid	iVala			
127	n-valeric acid	nVala	x	-	x
128	α-ketoglutaric acid	αKeto	x	-	x
129	citraconic acid	Citrc			
130	itaconic acid	Itaco			

131	mesaconic acid	Mesac			
132	levulinic acid	Levul			
133	a-ketoisovaleric acid	aKiVal			
134	a-ketovaleric acid	akVala			
135	glutaric acid	Gluta			
136	adipic acid	Adipa			
137	n-caproic acid	Capra	x	x	x
138	l-a-hydroxyisocaproic acid	hiCap			
139	picolinic acid	Picol			
140	dl-isocitric acid	iCita			
141	citric acid	Cita			
142	sorbic acid	Sorba			
143	(-)-shikimic acid	Shiki			
144	pimelic acid	Pimel			
145	suberic acid	Suber			
146	dipicolic acid	Dipic			
147	o-coumaric acid	oCoum			
148	p-coumaric acid	pCoum			
149	sebacic acid	Sebac	x	-	x
150	heptanoic acid	Hepta	x	x	-
151	azelaic acid	Azel			
152	capric acid	Capri			
153	oleic acid	Oleic	x	x	x
154	deoxycholic acid	Doxyc	x	x	x
155	imidazole	Imida			
156	succinimide	Succi			
157	uracil	Urac			
158	barbituric acid	Barba			
159	cytosine	Cytos			
160	creatinine (2-amino-1-methyl-2-imidazolin-4-one)	Crtin			
161	orotic acid	Orota			
162	xanthine	Xanth	x	x	x
163	hypoxanthine	Hypox			
164	adenine	Adeni			
165	thymine	Thymi			
166	nicotinic acid	Nicot			
167	4-nitrocatechol	NiCat			
168	niacinamide (nicotinamid)	Niaci			
169	catechol	Catec			
170	benzoic acid	Benzo			
171	p-hydroxybenzoic acid	hBenz			
172	salicylic acid	Salic			
173	p-aminobenzoic acid	aBenz			
174	m-hydroxybenzoic acid	mhBen			
175	protocatechuic acid	ProCa			
176	gallic acid	Galli			
177	anthranilic acid	Anthr			
178	3-aminobenzamide	3aBen			
179	phenylacetic acid	Phaa			
180	d(-)-mandelic acid	DMand			
181	dl-mandelic acid	DLMan			
182	isovanillic acid	iVana			
183	vanillic acid	Vana			
184	3-acetamidophenol	3aaPH			
185	coumarin	Coum			
186	guanosine 2'-monophosphate	GuamP			
187	guanosine	Guano			
188	thiamine	Thiam			
189	(+)-catechin	Catei			
190	folic acid	Folic			
191	taurocholic acid	Tauro			
192	growth control	GC			

c) Taxa profile E

no.	agent/assay	abb.	C.a.	CEM 8	C.d.
aminopeptidase assays with βNA					
1	Gly- β NA	G	x	x	x
2	D-Ala- β NA	dA			
3	L-Ala- β NA	lA	x	x	x
4	β -Ala- β NA	β A			
5	Val- β NA	V	x	x	x
6	H-Val-4-M β NA	V4M	x	-	-
7	Leu- β NA	lL	x	x	x
8	D-Leu- β NA	dL			
9	Ile- β NA	I	x	x	x
10	Pro- β NA	P	x	x	x
11	H-Hydroxyprolin- β NA	HP	x	x	x
12	Phe- β NA	F	x	x	x
13	Glytaryl-Phe- β NA	GyF			
14	Trp- β NA	W	x	x	-
15	H-DL-Met- β NA	M	x	x	x
16	Ser- β NA	S	x	x	x
17	Thr- β NA	T	x	x	x
18	Cys- β NA	C			
19	Tyr- β NA	Y	x	x	x
20	Gln- β NA	Q			
21	Asn- β NA	N			
22	Asp- β NA	D			
23	Glu- β NA	E			
24	Glu(β NA)-OH	E β Na			
25	Lys- β NA	K	x	x	x
26	Arg- β NA	R	-	?	x
27	Bz-DL-Arg- β NA	BzdLR			
28	Bz-Arg- β NA	BzR			
29	His- β NA	H	x	x	x
30	Orn- β NA	Orn			
31	Pyr- β NA	Pyr			
32	Hyp- β NA-HCl	Hyp	x	x	x
33	H-Cit- β NA	CIT			
34	Gly-Gly- β NA	GG			
35	Gly-Ala- β NA	GA	x	x	x
36	Gly-Pro- β NA	GP	x	x	x
37	Gly-Phe- β NA	GF	x	x	x
38	Gly-D-Phe- β NA	GdF			
39	Gly-Trp- β NA	GW			
40	Gly-Arg- β NA	GR			
41	Ac-Gly-Lys- β NA	AcGK			
42	Ala-Ala- β NA	AA	?	x	x
43	D-Ala-D-Ala	dAdA			
44	Ala-Arg- β NA	AR			
45	Leu-Gly- β NA	LG	x	-	x
46	Pro-Arg- β NA	PR			
47	Phe-Pro- β NA	FP	x	x	x
48	Phe-Arg- β NA	FR			
49	Ser-Tyr- β NA	SY			
50	Asp-Ala- β NA	DA			
51	Asp-Lys- β NA	DK			
52	Asp-Arg- β NA	DR			
53	Glutaryl-Asp-Lys- β NA	GyDK			
54	Glu-Glu- β NA	EE			
55	Glu-His- β NA	EH			
56	Arg-Arg- β NA	RR			
57	Ac-Lys-Ala- β NA	AcKA			
58	Ac-Lys-Arg- β NA	AcKR			
59	His-Ser- β NA	HS			
60	Gly-Pro-Leu- β NA	GPL			
61	Glutaryl-Gly-Gly-Phe- β NA	GyGGF			
62	Ala-Ala-Phe- β NA	AAF			
63	Ala-Pro-Ala- β NA	APA			

64	Ala-Phe-Pro-βNA	AFP			
65	Ala-Ala-Ala-βNA	AAA			
66	Val-Tyr-Ser-βNA	VTS			
67	Pro-Lys-Ala-βNA	PKA			
68	Phe-Pro-Ala-βNA	FPA	x	x	-
69	Suc-Phe-Gly-Leu-βNA	sFGL			
70	Suc-Tyr-Gly-Leu-βNA	sYGL			
71	His-Leu-His-βNA	HLH			
72	Pyr-His-Pro-βNA	PyHP			
73	Pyr-His(Bzl)-Pro-βNA	PyHBP			
74	Ala-Leu-Tyr-Leu-βNA	ALYL			
75	Ala-Pro-Ala-Arg-βNA	APAR			
76	Ala-Phe-Pro-Ala-βNA	AFPA			
77	Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-βNA	AcAAPA			
78	Leu-Leu-Val-Tyr-Ser-βNA	LLVYS			
79	Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-βNA	G4DK			
80	Pep-Kontrolle	PepK			
	aminopeptidase assays with pNA				
81	Gly-pNA	GNA			
82	L-Ala-pNA	LANA	x	x	x
83	d-Ala-pNA	DANA			
84	Val-pNA	VNA			
85	Leu-pNA	LNA	x	x	x
86	Glu-pNA	ENA			
87	Pro-pNA	PNA	x	x	x
88	Phe-pNA	FNA			
89	Asp-pNA	DNA			
90	Glu(pNA)-OH	ENAOH			
91	Lys-pNA	KNA	x	x	-
92	Arg-pNA	RNA	x	x	-
93	Bz-DL-Arg-PNA	BzRNA			
94	Pyr-pNA	PYRNA			
95	Gly-Pro-pNA	GPNA			
96	Ala-Phe-Pro-pNA	AFPNA			
	glucosidase/phosphatase assays pH 7.5 & pH 8.2				
97	p-nitrophenyl α-l-arabinopyranoside	aARA7			
98	p-nitrophenyl β-l-arabinopyranoside	βARA7			
99	p-nitrophenyl α-l-arabinofuranoside	aARAF7			
100	p-nitrophenyl β-d-xylopyranoside	PNPX7			
101	o-nitrophenyl β-d-xylopyranoside	ONPX7			
102	p-nitrophenyl α-d-xylopyranoside	aXYL7			
103	p-nitrophenyl β-d-galactopyranoside	PNPG7			
104	p-nitrophenyl α-d-galactopyranoside	aGAL7			
105	o-nitrophenyl α-d-galactopyranoside	oaGAL7			
106	p-nitrophenyl 1-thio-β-d-galactopyranoside	tβGAL7			
107	2-methoxy-4-(2-nitrovinyl)-phenyl β-d-galactopyranoside	2vβGAL			
108	o-nitrophenyl β-d-galactopyranoside 6-phosphate	GAL6P7			
109	p-nitrophenyl n-acetyl-β-d-galactosaminide	nβGAA7	x	x	x
110	o-nitrophenyl-n-acetyl-α-d-galactosaminide	naGAA7			
111	o-nitrophenyl-n-acetyl-β-d-galactosaminide	onGAA7			
112	p-nitrophenyl α-l-fucopyranoside	aIFUC7			
113	p-nitrophenyl β-l-fucopyranoside	βIFUC7			
114	p-nitrophenyl β-d-fucopyranoside	βdFUC7			
115	p-nitrophenyl β-d-thiofucopyranoside	βtFUC7			
116	p-nitrophenyl α-d-glucopyranoside	aGLU7	x	x	x
117	p-nitrophenyl β-d-glucopyranoside	βGLU7	x	x	x
118	p-nitrophenyl 1-thio-β-d-glucopyranoside	tβGLU7			
119	p-nitrophenyl n-acetyl-α-d-glucosaminide	aCHIT7			
120	p-nitrophenyl n-acetyl-β-d-glucosaminide	CHIT7	x	x	x
121	p-nitrophenyl n-acetyl-1-thio-β-d-glucosaminide	nGLUA7			
122	p-nitrophenyl α-d-mannopyranoside	aMAN7			
123	p-nitrophenyl β-d-mannopyranoside	βMAN7			
124	p-nitrophenyl β-d-glucuronide	PGUR7			
125	p-nitrophenyl α-l-rhamnopyranoside	aRHA7			
126	p-nitrophenyl β-d-cellobioside	βCEL7			
127	p-nitrophenyl α-d-maltoside	aMAL7	-	x	x

128	p-nitrophenyl β -d-maltoside	β MAL7	-	x	x
129	p-nitrophenyl β -d-lactopyranoside	β LAC7			
130	4-nitro-a-d-maltoheptaoside-4,6,o-ethylidene	aAMY7			
131	thymidine 5'-monophosphate-p-nitrophenol	t5MP7			
132	2'-deoxythymidine-5'-p-nitrophenyl-phosphate	DIP7			
133	p-nitrophenyl phosphate di(2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol)	PHOS7	x	x	x
134	bis-p-nitrophenyl-phosphate	BISPH7	x	x	x
135	p-nitrophenyl-phosphorylcholin	PHCHO7	x	x	x
136	p-nitrophenyl-sulfate	SULF7	x	x	x
137	3-indoxyl sulfate	INDS7			
138	p-nitrocatechol sulfate	CATS7	x	x	x
139	o-nitrophenyl-acetate	oACET7			
140	p-nitrophenyl-acetate	pACET7	x	x	x
141	p-nitrophenyl butyrate	BUT7	x	x	x
142	p-nitrophenyl phosphate di(2-am.-2-ethyl-1,3-propanediol)	PHOS8	x	x	x
	glucosidase/phosphatase assays pH 4.0 & pH 5.5				
143	p-nitrophenyl β -d-xylopyranoside	PNPX4			
144	p-nitrophenyl β -d-galactopyranoside	PNPG4			
145	p-nitrophenyl β -d-fucopyranoside	β dFUC4			
146	p-nitrophenyl n-acetyl- β -d-galactosaminide	n β GAA4			
147	p-nitrophenyl a-d-glucopyranoside	aGLU4	x	x	-
148	p-nitrophenyl β -d-glucopyranoside	β GLU4	x	x	-
149	p-nitrophenyl n-acetyl-a-d-glucosaminide	aCHIT4			
150	p-nitrophenyl a-d-mannopyranoside	aMAN4			
151	p-nitrophenyl β -d-glucuronide	PGUR4			
152	p-nitrophenyl β -d-cellobioside	β CEL4			
153	p-nitrophenyl phosphate di(2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol)	PHOS4	x	x	-
154	p-nitrophenyl a-l-arabinopyranoside	aARA5			
155	p-nitrophenyl β -l-arabinopyranoside	β ARA5			
156	p-nitrophenyl β -d-xylopyranoside	PNPX5			
157	p-nitrophenyl β -d-galactopyranoside	PNPG5			
158	p-nitrophenyl-a-d-galactopyranoside	aGAL5			
159	o-nitrophenyl a-d-galactopyranoside	oaGAL5			
160	p-nitrophenyl β -d-fucopyranoside	β dFUC5			
161	p-nitrophenyl n-acetyl- β -d-galactosaminide	n β GAA5			
162	p-nitrophenyl a-d-glucopyranoside	aGLU5			
163	p-nitrophenyl β -d-glucopyranoside	β GLU5			
164	p-nitrophenyl n-acetyl-a-d-glucosaminide	aCHIT5			
167	p-nitrophenyl n-acetyl- β -d-glucosaminide	CHIT5			
168	p-nitrophenyl a-d-mannopyranoside	aMAN5			
170	p-nitrophenyl β -d-mannopyranoside	β MAN5			
171	p-nitrophenyl β -d-glucuronide	PGUR5			
172	p-nitrophenyl a-l-rhamnopyranoside	aRHA5			
165	p-nitrophenyl β -d-cellobioside	β CEL5			
166	p-nitrophenyl a-d-maltoside	aMAL5	x	x	-
169	p-nitrophenyl phosphate di(2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol)	PHOS5			
	classic assays				
173	tetrathionate reductase	TTR			
174	Voges-Proskauer-reaction	VP			
175	hydrolysis of esculin	ESC			
176	formation of H ₂ S	H ₂ S			
177	control for decarboxylase reactions	DECO			
178	control for ESC and H ₂ S	H ₂ S/ESCO			
179	arginin dihydrolase	ADH			
180	glutamate decarboxylase	GDC			
181	lysin decarboxylase	LDC			
182	ornithin decarboxylase	ODC			
183	urease	UREI			
184	urease + l-methionine-sulphoximine	UREII			
185	arylsulphatase	AST			
186	hydrolysis of hippurate	HIP			
187	formation of indol	IND			
188	nitrate reduction	NTA			

189	nitrite reduction	NTI			
190	pyrazinamidase	PCA			
191	control of pyrazinamidase reaction	PCC			
192	tryptophandesaminase	TDA			

Tab. 6.2 Filamentierungsintensität der Teststämme unter Variation der Inkubationsbedingungen

Sabouraudagar mit und ohne CO₂ sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da sich bei keinem der Stämme Ausläufer fanden.

In der Spalte „Spezies“ bedeutet ca jeweils *C.albicans*, cd *C.dublinsiensis*, sc *S.cerevisiae* und ct *C.tropicalis*. In der Spalte „Patient“ ist die Grunderkrankung des Patienten aufgeführt, wobei TX einen Zustand nach Organtransplantation bezeichnet.

Nr.	Isolat-Nr.	Isol.	Spezies	Studien-Nr.	Patient	KB CO ₂	KB	B CO ₂	B	KB 30°C
1	88326	II	ca	HA-01	HIV	+++	+-	-	-	-
2	85733	I	cd	HD-01	HIV	-	-	-	-	-
3	85733	II	sc			-	-	-	-	-
4	85734	I	cd	HD-02	HIV	-	-	-	-	-
5	83753	I	cd	HD-03	HIV	-	-	-	-	-
6	83753	II	ct			-	-	-	-	-
7	90353		ca	HA-02	HIV	+++	+-	+-	-	+-
8	92682		ca	HA-03	HIV	+++	+-	+-	-	-
9	93155	II	ca	HA-04	HIV	++	+-	-	-	-
10	96287		ca	HA-05	HIV	+++	++	+++	+-	+
11	96569	I	ca	HA-06	HIV	+++	+	-	-	+-
12	96569	II	ca	HA-07	HIV	+++	+	+-	-	+-
13	98750		ca	HA-08	HIV	+++	+	+-	-	-
14	98770		ca	HA-09	HIV	+++	+	++	-	+
15	99074		ca	HA-10	HIV	+++	+-	+	-	-
16	99235	II	ca	HA-11	HIV	+++	+	+++	(+)-	+-
17	99468	II	ca	HA-12	HIV	+++	+-	+++	-	-
18	100307	I	ca	HA-13	HIV	+++	+	+-	-	+-
19	100307	II	cd	HD-04	HIV	-	-	-	-	-
20	100431		ca	Ha-14	HIV	+++	+-	-	-	-
21	100432	II	ca	HA-15	HIV	++	+-	-	-	-
22	100435	I	ca	HA-16	HIV	++	+-	-	-	-
23	100435	II	ca	HA-17	HIV	++	+-	-	-	+-
24	100660	I	cd	HD-05	HIV	-	-	-	-	-
25	100660	II	cd	HD-06	HIV	-	-	-	-	-
26	100661	I	ca	HA-18	HIV	+++	+	+	-	-
27	100803		ca	HA-19	HIV	+++	+++	+-	-	++
28	101031		ca	HA-20	HIV	+++	+	+-	-	-
29	101163		cd	HD-07	HIV	-	-	-	-	-
30	101343		ca	HA-21	HIV	+++	-	-	-	-
31A	101344		ca	HA-22	HIV	+++	-	-	-	-
31B	101353		ca	HA-23	HIV	+++	-	-	-	-
32	101354		ca	HA-24	HIV	+++	-	-	-	-
33	101355		ca	HA-25	HIV	+++	-	-	-	-
34	100791		ca	HA-26	HIV	++	++	+-	-	+-
35	7109	II	cd	HD-08	HIV	+-	-	-	-	-

36	101622	II	ct		HIV	++	+	++	-	+
37	102020		ca	HA-27	HIV	+++	+	+/-	-	+/-
38	102021		ca	HA-28	HIV	+++	+/-	++	(+)-	-
39	102241	I	ca	HA-29	HIV	+++	+	+/-	-	-
40	102569		ca	HA-30	HIV	+++	+/-	+/-	-	-
41	104795	I	cd	HD-08	HIV	-	-	-	-	-
42	104796		ca	Ha-31	HIV	+++	-	+/-	-	-
43	105045		cd	HD-10	HIV	-	-	-	-	-
44	106003		cd	HD-11	HIV	-	-	-	-	-
45	109659		cd	HD-12	HIV	-	-	-	-	-
46	109932		cd	HD-13	HIV	-	-	-	-	-
47	110049		ca	HA-32	HIV	+++	++	++	(+)-	+/-
48	111372		cg+cd			(+)-	-	-	-	-
49	111374		cd	HD-14	HIV	-	-	-	-	-
50	111629		cd	HD-15	HIV	-	-	-	-	-
51	109061		cd	HD-16	HIV	-	-	-	-	-
52	109514		cd	HD-17	HIV	-	-	-	-	-
54	117758		cd	HD-18	HIV	-	-	-	-	-
55	118555		ca	HA-33	HIV	+++	+/-	+/-	-	-
56	120367		ca	HA-34	HIV	+++	++	++	-	+/-
57	120789	II	cd	HD-19	HIV	+	-	++	-	-
58	121398		ca	HA-35	HIV	+++	+	++	(+)-	+/-
59	121509		ca	HA-36	HIV	+++	+	++	-	+/-
60	123000		ca	HA-37	HIV	+++	+/-	+	-	+/-
61	123531		ca	HA-38	HIV	+++	+	+	-	-
62	125130	I	cd	HD-20	HIV	+	+/-	+/-	-	+/-
63	125965		ca	HA-39	TX	+++	+	++	-	-
64	126577	I	ca	HA-40	TX	+++	+	+++	(+)-	-
65	126591		ca	HA-41	HIV	+++	-	-	-	-
66	126683		ca	HA-42	TX	+++	+/-	+/-	-	-
67	126787	I	ca	HA-43	TX	+++	+/-	+/-	-	-
68	126788	II	ca	HA-44	TX	+++	++	+	-	-
69	126787	II	ca	HA-45	TX	+++	+	+	-	-
70	126788	I	ca	HA-46	TX	++	+/-	-	-	-
71	126826	I	ca	HA-47	HIV	+++	+/-	-	-	-
72	127145		ca	HA-48	TX	+++	++	+++	+/-	+
73	127285		ca	HA-49	TX	+++	++	++	-	+/-
74	127287		ca	HA-50	TX	++	+	+/-	-	+/-
75	127432		ca	HA-51	TX	+++	-	+/-	-	-
76	127617		ca	HA-52	TX	+++	+	+/-	-	+/-
77	127779		cd	HD-21	HIV	-	-	-	-	-
78	128083		ca	HA-53	TX	++	+/-	+/-	-	-
79	128084	I	ca	HA-54	TX	+++	++	+	-	+/-
80	128120		ca	HA-55	TX	+++	+	+/-	-	+/-
81	128146		ca	HA-56	TX	+++	++	+	-	+
82	128461		ca	HA-57	TX	++	-	+/-	-	-
84	128467		ca	HA-59	TX	++	-	-	-	-
85	128773		ca	HA-60	TX	+++	+	+	-	+/-
86	129138		ca	HA-61	TX	+++	++	++	(+)-	+
87	129158		ct			-	-	+/-	-	-
88	129436		ca	HA-62	TX	++	+	-	-	-
89	129949		ca	HA-63	TX	+++	++	+/-	-	+/-
90	130147		ca	HA-64	TX	+++	+	+	-	+/-
91	130227		ca	HA-65	TX	+++	+	+/-	-	-
92	130391		ca	HA-66	TX	+++	+/-	+/-	-	-
93	130797		ca	HA-67	TX	+++	+++	++	-	+
94	130920		ca	HA-68	TX	+++	++	+++	-	+
95	131132		ca	HA-69	HIV	++	+/-	+/-	-	-
96	131636		ca	HA-70	HIV	+++	+/-	+/-	-	-
97	131788		ca	HA-71	TX	+++	+	++		+
98	131803		ca	HA-72	HIV	+++	+	+	-	+/-
99	131921		ca	HA-73	TX	+++	+	+/-	-	+/-

100	132016		ca	HA-74	HIV	+++	+ -	+	-	-
101	132017		ca	HA-75	HIV	+++	+	+++	(+)-	+ -
102	132018		ca	HA-76	HIV	+++	++	+++	+ -	+
103	132448		ca	HA-77	HIV	+++	+ -	+ -	-	-
104	132909		ca	HA-78	TX	+++	++	+	-	+
105	133451		ca	HA-79		+++	++	++	-	+ -
106	133637		ca	HA-80	HIV	+++	+ -	+ -	-	-
107	133791		ca	HA-81	TX	+++	++	+	-	-
108	134250		ca	HA-82	TX	+++	+ -	++	-	+
109	134614		ca	HA-83	HIV	+++	+ -	++	(+)-	-

Stämme aus einer unveröffentlichten Studie von Dr. W. Heinz

	interne Nr.	Spezies	KB CO ₂	KB	B CO ₂	B
110	212	ca	+++	++	+	+ -
111	370	cd	-	-	-	-
112	294	cd	-	-	-	-
113	111	cd	-	-	-	-
114	296	cd	-	-	-	-
115	298	cd	-	-	-	-
116	361	cd	-	-	-	-
117	284	cd	-	-	-	-
118	367	cd	-	-	-	-
119	272	cd	-	-	-	-
120	277	ca	+++	++	+ -	-
121	411	cd	-	-	-	-

Patientenisolate CF-Studie Würzburg

	Isolat-Nr.	interne Nr.	Spezies	Material	Patientengruppe	KB mit CO ₂
122	870199	M 104/2	cd	Sputum	CF	-
123	862290	566/1	cd	Rachenabstrich	CF	-
124	862287	592/3	cd	Rachenabstrich	CF	-
125	805978	696/6	cd	Sputum	CF	-
126	854735	512	cd	Sputum	V.a. Tbc	-
127	875503	18777	cd	Sputum	HIV	-
128	862281	392/6	cd	Sputum	CF	-
129	870241		cd	Sputum	CF	-
130	869681	3583	cd	Sputum	V.a. Tbc	-
131	861308		cd	Rachenabstrich	? ORSA	-
132	870141		cd			-
133		814 dg	cd	Stuhl		-
134		A 308 Cd	cd			-
135		Cd 4363100	cd			-
136		Sp 5892	ca			+++
137		Sp 5892	cd			-
138		361/1	cd			-

1. **Beck-Sagué, C. M., Jarvis, W. R.**, the National Nosocomial Infections Surveillance System. 1993. Secular Trends in the Epidemiology of nosocomial Fungal Infections in the United States, 1980-1990. *J. Inf. Diseases* **167**: 1247-1251
2. **Bernardis, F., Mühlischlegel, F. A., Cassone A., Fonzi W. A.** 1998. The pH of the Host Niche Controls Gene Expression in and Virulence of *Candida albicans*. *Inf. and Imm.*
3. **Boerlin, P., Boerlin-Petold, F., Durussel, Ch., Addo, M., Pagani, J.-L., Chave, J.-P., Bille, J.** 1995. Cluster of Oral Atypical *Candida albicans* Isolates in a Group of Human Immunodeficiency Virus-Positive Drug Users. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1129-1135
4. **Brandt, M. E., Harrison, L. H., Pass, M., Ofair, A. N., Huie, S., Li, R.-K., Morrison, Ch. J., Warnock, D. W., Hajjeh, R. A.** 2000. *Candida dubliniensis* Fungemia: the First Four Cases in North America. *Emerging Infectious Diseases* **6**: 46-49
5. **Braun, B. R., Johnson, A. D.** 2000. *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* Make Independent Contributions to Filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**: 57-67
6. **Brown, A. J. P., Gow, N. A. R.** 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends in Microbiology* **7**: 333-338
7. **Cole G.T.** 1991. Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can. J. Microbiol.* **37**: 637-646
8. **Coleman, D. C., Sullivan, D. J., Mossman, J. M.** 1997. *Candida dubliniensis*. *J. Clin Microbiol.* **35**: 3011-3012
9. **Davis, D., Wilson, R. B., Mitchell, A. P.** 2000. *RIM101*-Dependent and – Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. *Mol. cell. Biol.* **20**: 971-978
10. **Davis, D., Edwards, J. E. Jr., Mitchell, A. P., Ibrahim, A. S.** 2000. *Candida albicans RIM101* pH Response Pathway Is Required for Host-Pathogen Interactions. *Infect. Immun.* **68**: 5953-5959
11. **Denison, S. H., Orejas, M., Arst, H. N., Jr**, 1995. Signaling of Ambient pH in *Aspergillus* Involves a Cysteine Protease. *J. Biol. Chem.* **270**: 28519-28522
12. **Denison, S. H.** 2000. Review pH Regulation of Gene Expression in Fungi. *Fungal genetics and Biology.* **29**: 61-71
13. **Donnelly, S. M., Sullivan, D. J., Shanley, D. B., Coleman, D. C.** 1999. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology.* **145**: 1871-1882
14. **Drubin, D. G.** 1991. Development of Cell Polarity in Budding Yeast. *Cell.* **65**: 1093-1096
15. **Dujardin, L., Walbaum, S., Biguet, J.** 1980. Influence de la concentration du glucose et de l'azote sur la morphologie de *Candida albicans* et de la formation de ses Chlamydozoospores dans un milieu de culture synthétique. *Mycopathologia.* **71**: 113-118

16. **Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, L. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N., Wenzel, R. P.** 1999. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29: 239-244
17. **El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W. A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M., Mühlischlegel, F. A.** 2000. Dominant Active Allels of *RIM101 (PRR2)* Bypass the pH Restriction on Filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4635-4647
18. **Espeso, E. A., Penalva, M.A.** 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 Synthetase Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 28825-28830
19. **Espeso, E. A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, Ch.V., Valencia, A., Arst, H. N. Jr, Penalva, M. A.** 1997. Specific DNA Recognition by the *Aspergillus nidulans* Three Zinc Finger Transcription Factor PacC. *J. Mol. Biol.* 274: 466-480
20. **Espeso, E. A., Roncal, T., Diez, E., Rainbow, L., Bignell, E., Alvaro, J., Suarez, T., Denison, S. h., Tilburn, J., Arst, H. N. Jr, Penalva, M. A.** 2000. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19: 719-728
21. **Espeso, E. A., Arst, H. N. Jr.** 2000. On the Mechanism by which Alkaline pH Prevents Expression of an Acid-Expressed Gene. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3355-3363
22. **Fridkin S. K., Jarvis, W. R.** 1996. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 499-511
23. **Futai, E., Maedo, T., Sorimachi, H., Kitamoto, K., Ishiura, S., Suzuki, K.** 1999. The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 260: 559-568
24. **Gilfillan, G. D., Sullivan, D. J., Haynes, K., Parkinson, T., Coleman, D. C., Gow, N. A. R.** 1998. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 144: 829-838
25. **Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., Fink, G. R.** 1992. Unipolar Cell Divisions in the Yeast *S. cerevisiae* Lead to Filamentous Growth: Regulation by Starvation and RAS. *Cell.* 68: 1077-1090
26. **Jabra-Rizk, M. A., Baqui, A. A. M. A., Kelley, J. I., Falkler, W. A. Jr, Merz, W. G., Meiller, T. F.** 1999. Identification of *Candida dubliniensis* in a Prospective Study of Patients in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 37: 321-326
27. **Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A. Jr, Merz, W. G., Baqui, A. A. M. A., Kelley, J. I., Meiller, T. F.** 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
28. **Jarvis, W. R.** 1995. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections, with Emphasis on *Candida* Species. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1526-1530

29. **Kaur, S., Mishra, P., Prasad, R.** 1988. Dimorphism-associated changes in intracellular pH of *Candida albicans*. *Biochem. et Biophys. Acta.* **972**: 277-282
30. **Khalaf, A. R., Zitromer, R. S.** 2001. The DNA Binding Protein Rfg1 Is a Repressor of Filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **157**: 1503-1512
31. **Kirkpatrick, W. R.** 1998. Detection of *C. dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from HIV-infected Patients in North America by primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates. *J. Clin. Microb.* **36**: 3007-3012
32. **Kirkpatrick, W. R., Lopez-Ribot, J. L., Mcatee, R. K., Patterson, T. F.** 2000. Growth Competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under Broth and Biofilm Growing Conditions. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 902-904
33. **Kurzai, O., Korting, H.-Ch., Harmsen, D., Bautsch, W., Molitor, M., Frosch, M., Mühlschlegel, F. A.** 2000. Molecular and phenotypic identification of the Yeast Pathogen *Candida dubliniensis*. *J. Mol. Med.* **78**: 521-529
34. **Kurzai, O., Heinz, W.J., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., Frosch, M., Mühlschlegel, F. A.** 1999. Rapid PCR Test for Discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Isolates Using Primers Derived from the pH-Regulated *PHR1* and *PHR2* Genes of *C. albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1587-1590
35. **Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Loudec, F., Löpingle, A., Gaillardin, C.** 1997. Genetic Analysis of Regulatory Mutants Affecting Synthesis of Extracellular Proteinases in the Yeast *Yarrowia lipolytica*: Identification of a *RIM101/pacC* Homolog. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3966-3976
36. **Land, G. A., McDonald, W. C., Stjernholm, R. L., Friedman, L.** 1975. Factors Affecting Filamentation in *Candida albicans*: Changes in Respiratory Activity of *Candida albicans* During Filamentation. *Infect. Immun.* **12**: 119-127
37. **Li, W., Mitchell, A. P.** 1997. Proteolytic Activation of Rim1p, a Positive Regulator of Yeast Sporulation and Invasive Growth. *Genetics* **145**: 63-73
38. **Lo, H.-J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G. R.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. *Cell.* **90**: 939-949
39. **Lumsden, W. B., Duffus, J. H., Slaughter, J. C.** 1987. Effects of CO₂ on Budding and Fission Yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 877-881
40. **MacCabe, A. P., van den Hombergh, J. P. T. W., Tilburn, J., Arst, H. N. Jr, Visser, J.** 1996. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 367-374
41. **Mardon, D., Balish, E., Phillips, A. W.** 1969. Control of Dimorphism in a Biochemical Variant of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **100**: 701-707
42. **McCullough, M., Ross, B., Reade, P.** 1995. Characterization of Genetically Distinct Subgroup of *Candida albicans* Strains Isolated from Oral Cavities of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 696-700

43. **McCullough, M. J., Clemons, K. V., Stevens, D. A.** 1999. Molecular and Phenotypic Characterization of Genotypic *Candida albicans* Subgroups and Comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 417-421
44. **Meis, J. F. G. M., Ruhnke, M., De Pauw, B. E., Odds, F. C., Siegert, W., Verweij, P. E.** 1999. *Candida dubliniensis* Candidemia in Patients with Chemotherapy-Induced Neutropenia and Bone Marrow Transplantation. *Em. Infect. Dis.* 5: 150-153
45. **Mingot, J.-M., Tilburn, J., Diez, E., Bignell, E., Orejas, M., Widdick, D. A., Sarkar, S., Brown, Ch. V., Caddick, M. X., Espeso, E. A., Arst, H. N. Jr, Penalva, M. A.** 1999. Specificity Determinants of proteolytic Processing of *Aspergillus* PacC transcription Factor Are Remote from the Processing Site, and Processing Occurs in Yeast If pH Signalling Is Bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1390-1400
46. **Mingot, J. M., Espeso, E. A., Diez, E., Penalva, M. A.** 2001. Ambient pH Signaling Regulates Nuclear Localization of the *Aspergillus nidulans* PacC Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1688-1699
47. **Mock, R. C., Pollack, J. H., Hashimoto, T.** 1990. Carbon dioxide induces endotrophic germ tube formation in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 36: 249-253
48. **Montazeri, M., Hedrick, H. G.** 1984. Factors Affecting Spore Formation of a *Candida albicans* Strain. *Applied and Environ. Microbiol.* 47: 1341-1342
49. **Moran, G. P., Sullivan, D. J., Henman, M. C., McCreary, Ch. E., Harrington, B. J., Shanley, D. B., Coleman, D. C.** 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 Derivates in Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:617-623
50. **Moran, G. P., Sanglard, D., Donnelly, S. M., Shanley, D. B., Sullivan, D. J., Coleman, D. C.** 1998. Identification and Expression of Multidrug transporters responsible for Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1819-1830
51. **Mosaid Al A., Sullivan, D. J., Salkin, I. F., Shanley, D., Coleman, D. C.** 2001. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar. *J. Clin. Microbiol.* 39: 323-327
52. **Mühlschlegel, F. A., Fonzi, W. A.** 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
53. **Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Diez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. A., Penalva, M. A., Arst, H. N. Jr,** 1999. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* 33: 994-1003
54. **Odds, F. C., Bernaerts, R.** 1994. CHROMagar Candida, a new Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1923-1929
55. **Odds, F. C., van Nuffel, L., Dams, G.** 1998. Prevalence of *Candida dubliniensis* Isolates in a Yeast Stock Collection. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2869-2873

56. **Odds, F. C.** 2000. Pathogenic fungi in the 21st century
57. **Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N. Jr, Penalva, M. A.** 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes & Development* 9: 1622-1632
58. **Otero, R. C., Gaillardin, C.** 1996. Dominant mutations affecting expression of pH-regulated genes in *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 311-319
59. **Pfaller, M. A., Messer, S. A., Gee, S., Joly, S., Pujol, C., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., Soll, D. R.** 1999. In Vitro Susceptibilities of *Candida dubliniensis* Isolates Tested against the New Triazole and Echinocandin Antifungal Agents. *J. Clin. Microbiol.* 37: 870-872
60. **Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., Houston, A., Coffman, S., Hollis, R. J., The Sentry Participant Group.** 2000. Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 747-751
61. **Phan, Q. T., Belanger, P. H., Filler, S. G.** 2000. Role of Hyphal Formation in Interactions of *Candida albicans* with endothelial Cells. *Infect. Immun.* 68: 3485-3490
62. **Pincus, D. H., Coleman, D. C., Pruitt, W. R., Padhye, A. A., Salkin, I. F., Geimer, M., Bassel, A., Sullivan, D. J., Clarke, M., Hearn, V.** 1999. Rapid Identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems. *J. Clin. Microbiol.* 37:3533-3539
63. **Pinjon, E., Sullivan, D. J., Salkin, I., Shanley, D., Coleman, D. C.** 1998. Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2093-2095
64. **Polacheck, J.** Recovery of *C. dubliniensis* from Non-HIV-Infected Patients in Israel
65. **Pollack, J. H., Hashimoto, T.** 1988. The requirements for bicarbonate and metabolism of the inducer during germ tube formation by *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 34: 1183-1188
66. **Porta, A., Ramon, A. M., Fonzi, W. A.** 1999. PRR1, a Homolog of *Aspergillus nidulans* pAlF, Controls pH-Dependent Gene Expression and Filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 7516-7523
67. **Quindos, G., Carillo-Munoz, A. J., Arévalo, M. P., Salgado, J., Alonso-Vargas, R., Rodrigo, J. M., Ruesga, M. T., Valverde, A., Peman, J., Canton, E., Martin-Mazuelos, E., Ponton, J.** 2000. In vitro Susceptibility of *Candida dubliniensis* to Current and New Antifungal Agents. *Chemotherapy* 46: 395-401
68. **Ramon, A. M., Porta, A., Fonzi, W. A.** 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

69. **Raudonis, B. M., Smith, A. G.** 1982. Germination of the chlamydospores of *Candida albicans*. *Mycopathologia* 78: 87-91
70. **Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R., Kumamoto, C. A.** 1999. Invasive Lesions Containing Filamentous Forms Produced by a *Candida albicans* Mutant That Is Defective in Filamentous Growth in Culture. *Inf. Immun.* 67: 3649-3652
71. **Ruhnke, M., Schmidt-Westhausen, A., Morschhäuser, J.** 2000. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 291-295
72. **Saporito-Irwin, S. M., Birse, Ch. E., Sypherd, P. S., Fonzi, W. A.** 1995. *PHR1*, a pH-Regulated Gene of *Candida albicans*, Is Required for Morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15: 601-613
73. **Schoofs, A., Odds, F. C., Colebunders, R., Ieven, M., Goossens, H.** 1997. Use of Specialised Isolation Media for Recognition and Identification of *Candida dubliniensis* Isolates from HIV-Infected Patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 296-300
74. **Sharkey, L. L., McNemar, M. D., Saporito-Irwin, S. M., Sypherd, P. S., Fonzi, W. A.** 1999. *HWP1* Functions in the Morphological Development of *Candida albicans* Downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J. Bacteriol.* 181: 5273-5279
75. **Sims, W.** 1986. Effect of carbon dioxide on the growth and form of *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 22: 203-208
76. **Sonneborn, A., Bockmühl, D. P., Ernst J. F.** 1999. Chlamydospore Formation in *Candida albicans* Requires the Efg1p Morphogenetic Regulator. *Inf. Immun.* 67: 5514-5517
77. **Staib, P., Morschhäuser, J.** 1999. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42: 521-524
78. **Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, Ch. E., Ernst, J. F.** 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
79. **Stryer, L.** Biochemie, 4.Auflage, 1996, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
80. **Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Haynes, K. A., Bennett, D. E., Coleman, D. C.** 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141: 1507-1521
81. **Sullivan, D. J., Henman, M. C., Moran, G. P., O'Neill, L. C., Bennett, D. E., Shanley, D. B., Coleman, D. C.** 1996. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species.
82. **Sullivan, D. J., Haynes, K., Bille, J., Boerlin, P., Rodero, L., Lloyd, S., Nenman, M., Coleman, D.** 1997. Widespread Geographic Distribution of Oral *Candida dubliniensis* Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *J. Clin. Microbiol.* 35: 960-964

83. **Sullivan, D., Coleman, D.** 1998. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. J. Clin. Microbiol. 36: 329-334
84. **Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A., Arst. H. N. 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
85. **Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, K., Franz, T., Naumann, D.** 2000. Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*. J. Clin. Microbiol. 38:1599-1608
86. **Torosantucci, A., Cassone, A.** 1983. Induction and morphogenesis of chlamydospores in an agerminative variant of *Candida albicans*. Sabouraudia 21: 49-57
87. **Tsuchimori, N., Sharkey, L. L., Fonzi, W. A., French, S. W., Edwards, J. E. Jr, Filler, S. G.** 2000. Reduced Virulence of *HWP1*-Defizient Mutants of *Candida albicans* and Their Interactions with Host Cells. Inf. Immun. 68: 1997-2002
88. **Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Krcmery, V., De Pauw, B., Meunier, F., the Invasive Fungal Infection Group of EORTC.** 1999. Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Clin. Infect. Dis. 28: 1071-1079

Lebenslauf

Name: Monika Wicker
Anschrift: Semmelweisstr. 1
86156 Augsburg
Telefon: 0821/4300700
E-mail: monika_wicker@web.de

Geburtsdatum: 29. Januar 1975
Geburtsort: Lindenberg im Allgäu
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981-1985 Grundschule Weiler
1985-1994 Gymnasium Lindenberg
Studium: 1995-2001 Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
2001-2002 Humanmedizin (PJ) an der LMU München

Famulaturen 8/1997 Chirurgie mit Notaufnahme am Dr. Otto-Geßler-
Krankenhaus Lindenberg
8/1998 Anästhesie am Zentralklinikum Augsburg
9/1998 Innere Medizin mit Palliativmedizin am St. Michael-
Krankenhaus Völklingen
3/1999 Praxisfamulatur Allgemeinmedizin in Weiler
8/1999 Geburtshilfe am Zentralklinikum Augsburg

Praktisches Jahr 1.Tertial Chirurgie am GZO-Spital Wetzikon unter Dr. R. Stie-
ger
2.Tertial Neurologie am Friedrich-Baur-Institut in München un-
ter Prof. Dr. D. Pongratz
3.Tertial Innere Medizin an der I. Medizinischen Klinik am
Zentralklinikum Augsburg unter Prof. W. von Scheidt

AiP-Zeit	1.7.2002 bis 31.12.2003	Innere Medizin an der III. Medizinische Klinik am Zentralklinikum in Augsburg unter Priv.-Doz. H. Messmann
Momentane beruf- liche Tätigkeit	seit 1.1.2004	Assistenzärztin an der III. Medizinische Klinik am Zentralklinikum in Augsburg unter Priv.-Doz. H. Messmann
Wissenschaftliche Tätigkeit	2000/2001	Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. M. Frosch Arbeitsgruppe Dr. F. Mühlischlegel
		Dissertation: „Vergleichende Analyse der morphologischen Flexi- bilität von <i>C.albicans</i> und <i>C.dubliniensis</i> unter be- sonderer Berücksichtigung des Transkriptions-faktors Rim101“
		Zusatzthema: „Die Bedeutung der FKS-Glukan-Synthetase für Morphologie und Lebensfähigkeit von <i>C.glabrata</i> “
	9/2000	Vortrag im Rahmen der MYK 2000 in Berlin Thema: „Die FKS-Glukan-Synthetase von <i>C.glabrata</i> “

Augsburg, den 26. April 2004

M. Wido