
Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1 Allgemeine Einführung	1
1.2 Die Gattung <i>Candida</i> und ihre klinische Bedeutung	2
1.2.1 <i>Candida albicans</i> - die medizinisch bedeutendste Art	3
1.2.2 Zunehmende Bedeutung weiterer <i>Candida</i> -Arten im klinischen Alltag	4
1.3 Pathogenitätsfaktoren von <i>Candida</i>	6
1.4 Diagnostik von <i>Candida</i>-Infektionen	8
1.5 Aufbau der Pilzzellwand und ihre Bedeutung für die antimykotische Therapie ..	10
1.6 Therapie von <i>Candida</i>-Infektionen und Resistenzentwicklung	11
1.7 Das RHO1 - Gen und seine Bedeutung	16
1.8 Regulation der β-1,3-Glucansynthese in der Zellwandsynthese von Hefepilzen durch das RHO1- Gen	20
1.9 Fragestellung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Pilzstämme	23
2.1.2 Geräte	23
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen	25
2.1.3.2 Enzyme, Puffer und Reagenzien (Fertiglösungen).....	26
2.1.3.3 Oligonukleotide.....	26
2.1.3.4 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	27
2.1.3.5 Weitere Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4 Spezielle Software	28

2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Kulturelle Auswahl der Stämme	28
2.2.2	Herstellung einer Pilzkultur	30
2.2.3	DNA – Präparation.....	30
2.2.3.1	DNA-Präparation durch Hitzeaufschluss ohne nachfolgende Aufreinigung ..	31
2.2.3.2	Messung der optischen Dichte der Pilzkultur	31
2.2.3.3	Quantifizierung von Zellen	31
2.2.3.4	„Klassische“ - DNA-Präparation	32
2.2.3.5	Phenol/Chloroform – Extraktion	32
2.2.3.6	Ethanolpräzipitation	33
2.2.3.7	Messen der DNA-Konzentration	33
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.2.4.1	Durchführung der PCR	34
2.2.4.2	Aufreinigung des PCR-Produkts mit Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation.....	35
2.2.4.3	Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem QIAquick PCR Purification Kit	36
2.2.5	Nachweis des Amplikons mittels Gelelektrophorese	37
2.2.5.1	Herstellung von Agarosegelen	37
2.2.5.2	Gelelektrophorese	37
2.2.6	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	38
2.2.7	DNA-Sequenzierung.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Geeignete Polymerasen, Primer und Restriktionsenzyme	40
3.2	Beschreibung einer optimierten Methode zur PCR von <i>Candida albicans</i>.....	41
3.2.1	Vergleich der ausgewählten Primer mit bekannten Primern	41
3.2.2	Einfluß von Denaturationszeit, Annealingtemperatur und Extensionszeit auf die Amplifizierung	42
3.2.3	Überprüfung des OD-Wertes als Meßgröße für die DNA-Konzentration mit verschiedenen Verfahren	44
3.2.4	Vergleich der verschiedenen DNA-Präparationsmethoden und experimenteller Nachweis der Nachweisgrenze der PCR zur Ermittlung der optimalen DNA- Ausgangsmenge für die PCR.....	45

3.3	Prüfung des Vorhandenseins des RHO1 - Gens in <i>Candida albicans</i> Stämmen.	50
3.3.1	Nachweis des RHO1-Gens in <i>Candida albicans</i> Stämmen	50
3.4	Nachweis von Mikroheterogenitäten anhand der Schnittmuster der Restriktionsenzyme	54
3.5	Nachweis des RHO1-Gens in ausgewählten <i>Candida</i> Spezies und <i>Trichosporon mucoide</i>	58
3.5.1	Prüfung der Stämme auf das Vorkommen des RHO1-Gens	58
3.5.2	Bestätigung des Nachweises eines RHO1-ähnlichen Musters bei weiteren Stämmen der <i>Candida</i> Spezies: <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. tropicalis</i> und <i>C. parapsilosis</i>	64
3.5.3	Vergleich der Schnittbilder nach Restriktion des RHO1-Gens mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen innerhalb der <i>Candida</i> Spezies	67
3.6	Sequenzierung der RHO1-ähnliche Bandenmuster enthaltenden <i>Candida</i>-Spezies	74
3.6.1	Darstellung der Nukleotidsequenzen der RHO1-ähnliche Muster enthaltenden <i>Candida</i> Spezies	74
3.6.2	Darstellung und vergleichende Betrachtung der Aminosäure-sequenzen der RHO1-ähnliche Muster enthaltenden <i>Candida</i> Spezies mit der Aminosäuresequenz des RHO1-Gens von <i>C. albicans</i>	78
4	DISKUSSION	88
4.1	Diskussion der Methoden	88
4.1.1	Quantifizierung der Pilzzellen einer Übernachtskultur	88
4.1.2	DNA-Präparationsmethoden	88
4.1.3	Amplifizierung des RHO1-Gens mittels PCR	90
4.1.4	Agarosegelelektrophorese	92
4.1.5	Nachweis von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)	93
4.2	Diskussion der Ergebnisse	94
4.2.1	Nachweis des RHO1-Gens und RFLP-Analyse bei <i>C. albicans</i>	94
4.2.2	Nachweis des RHO1-Gens bei weiteren <i>Candida</i> -Spezies	97
4.2.3	RFLP-Analyse des RHO1-Gens bei den <i>Candida</i> -Spezies <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> und <i>C. lusitaniae</i>	99
4.2.4	Sequenzanalyse des RHO1-Gens bei den <i>Candida</i> -Spezies <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. tropicalis</i> und <i>C. parapsilosis</i>	100

4.2.5	Diskussion der RFLP des RHO1-Gens im Vergleich zur Sequenzanalyse bei den <i>Candida</i> -Spezies <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. tropicalis</i> und <i>C. parapsilosis</i>	105
4.2.6	Ausblick	114
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	119
	TABELLENVERZEICHNIS	122
	LITERATURVERZEICHNIS	123
	LEBENS LAUF	144
	ERKLÄRUNG	145
	DANKSAGUNG	146

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Allgemeine Einführung

Pilze wurden bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts (1837-39) als Infektionserreger erkannt [206]. Sie waren damit die ersten Mikroorganismen, die als Infektionserreger entdeckt wurden. Virchow führte dann die Krankheitsbezeichnung „Mykose“ ein [206]. Pilze sind Eukaryonten. Phylogenetisch lassen sich Pilze in die drei wichtigsten Gruppen: Ascomyceten (z.B. *Aspergillus*), Basidiomyceten (z.B. *Cryptococcus*) und Zygomyceten (z.B. *Mucorales*) unterteilen [72], wobei die Ascomyceten und Basidiomyceten enger verwandt sind [140]. Pilze, von denen nur ungeschlechtliche Fortpflanzungsphasen bekannt sind, werden als Deuteromyceten zusammengefasst [72; 140]. Die Gattung *Candida* zählt zu den Ascomyceten [72], innerhalb derer sie den Hemiascomyceten und innerhalb dieser den Saccharomycetales zugeordnet wird [72; 117]. *Candida* ist eine komplexe Gattung. Nach Kurtzman et al. [117] sind derzeit 163 anamorphe Spezies, aber auch etwa 11 teleomorphe Genera bekannt.

Eine Einteilung der medizinisch relevanten Pilze nach morphologischen Kriterien erfolgt in Sprosspilze wie *Candida*, Fadenpilze wie *Aspergillus* und dimorphe Pilze wie *Histoplasma capsulatum* [206;216]. Innerhalb der humanpathogenen Pilzspezies verursacht die Gattung *Candida* mit 70-80% den Hauptanteil der Pilzinfektionen [74]. Inzwischen sind etwa 200 *Candida*-Spezies bekannt [81; 49], von denen eine zunehmende Anzahl als pathogen einzustufen ist. Derzeit beläuft sich die Zahl der humanpathogenen *Candida*-Spezies auf ca. 20 [72], wobei etwa 15 davon häufig isoliert werden [171]. Diese *Candida*-Spezies haben im klinischen Alltag in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Eine essentielle Komponente der Gattung *Candida* ist die Zellwand, welche sowohl für die Pathogenität dieser Hefe, als auch als Zielstruktur für Antimykotika von enormer Wichtigkeit ist. Für die Synthese der Zellwand wird die β -1,3-Glucan-Synthetase benötigt [116]. Dieses Enzym, welches sich aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit zusammensetzt [45; 185; 90; 144], ist die Zielstruktur der Echinocandine, einer neuen antimykotischen Substanzklasse [116]. Die essentielle regulatorische Komponente der β -1,3-Glucan-Synthetase wird durch das RHO1-Gen verschlüsselt [45; 185; 144]. Neben dieser Funktion werden verschiedene Signaltransduktionswege bei Hefen durch das multifunktionelle Rho1 Protein reguliert.

In den folgenden Abschnitten werden die klinische Bedeutung der *Candida*-Spezies, wichtige Pathogenitätsfaktoren und aktuelle Therapiemöglichkeiten dargestellt. Darüber hinaus wird in diesem Kontext auf die Bedeutung von Strukturkomponenten der Pilzzellwand, die Zellwandsynthese und die damit verbundene Bedeutung des RHO1-Gens eingegangen, woraus abschließend die theoretischen und praktischen Zielstellungen dieser Arbeit abgeleitet werden.

1.2 Die Gattung *Candida* und ihre klinische Bedeutung

Seit den 80iger Jahren ist eine deutliche Zunahme von Pilzen als Hauptkrankheitserreger des Menschen zu beobachten, wobei weltweit die Sproßpilze der Gattung *Candida* am bedeutendsten sind [181]. Martin et al. zeigten in Ihrer Studie einen prozentualen Anstieg von 207% in der Inzidenz von Pilzen als Sepsiserreger in den USA in einem Zeitraum von 1979 bis 2000 [141]. Am häufigsten findet man *C. albicans*, durch den die Mehrzahl der *Candida*-Mykosen verursacht werden [165; 171; 49; 223; 224; 119]. Weitere häufig im klinischen Alltag isolierte humanpathogene Arten sind beispielsweise *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* und *C. glabrata* [181; 223; 224; 35]. *C. albicans* findet man bei Menschen und bei Warmblütlern. In der freien Natur, z. B. in der Erde oder im Wasser, ist *C. albicans* im Gegensatz zu anderen *Candida*-Arten nicht anzutreffen [20].

Die *Candida*-Hefen gehören zu den fakultativ pathogenen Mikroorganismen. Sie besiedeln auch bei gesunden Menschen Darm, Schleimhaut und Haut und leben dort als Kommensale [165; 49; 171; 130], wobei der Darm als Hauptstandort angesehen wird [130]. Bei den durch *Candida* verursachten Infektionen, z. B. der Mundhöhle, des Ösophagus und der Vagina handelt es sich demnach meist um endogene Infektionen. Eine antibiotische Langzeittherapie bzw. die Gabe von Breitspektrumantibiotika stellt einen wesentlichen Risikofaktor für das Auftreten von Candidämien dar. Weitere prädisponierende Faktoren für eine *Candida*-Infektion sind Diabetes [115; 97; 10; 17], Chirurgische Eingriffe, insbesondere die Abdominalchirurgie [68; 28; 130; 223, 171], und Verbrennungswunden [155; 15; 223]. Patienten von Intensivstationen sind besonders gefährdet an einer invasiven Candidiasis zu erkranken, wobei die Verlängerung der Verweildauer auf der ITS einen wesentlichen Risikofaktor darstellt [171; 223; 224; 55; 183]. Neben der zugrunde liegenden Erkrankung sind diese Patienten durch Faktoren wie parenterale Ernährung [61; 55; 171; 94], mechanische Beatmung [55], Dialyse [186; 19; 171] und Gefäßkatheter [171; 55; 139; 142; 127] zusätzlich gefährdet [115; 233; 238]. Die Kolonisation von zentralvenösen Kathetern, aber auch anderen bioprothetischen Devices, mit *Candida* spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung

invasiver *Candida*-Infektionen [139; 171]. Diese dienen für *Candida* als Substrate zur Ausbildung eines Biofilmes, der sie gegen eine Vielzahl von Antimykotika unempfindlicher macht [171; 114; 187]. Darüber hinaus stellt auch die Kolonisation der Schleimhaut des Patienten einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung von Candidämien dar [223; 49; 139; 94].

Bei der Abwehr einer Pilzinfektion sind die neutrophilen Granulozyten von entscheidender Bedeutung. Daher haben Patienten mit ausgeprägter Neutropenie bzw. langdauernden neutropenischen Phasen, z.B. infolge maligner hämatologischer Erkrankungen und damit verbundenen zytotoxischen Therapien, ein erhöhtes Risiko für invasive Candidosen [193; 138; 24; 223; 218]. Neben den Neutrophilen verhindern auch die T-Helfer-Lymphozyten eine Ausbreitung der *Candida*-Pilze im Wirt, da sie über die Freisetzung von Zytokinen Makrophagen aktivieren, welche die Pilzzellen phagozytieren. Beeinträchtigungen der zellulären Immunität im Rahmen einer Immunsuppression, z. B. hervorgerufen durch Zytostatikatherapie, Transplantationen [115; 84; 183; 56] oder HIV-Infektion bzw. AIDS [167; 228; 35; 87] führen zur Störung der Abwehrmechanismen und fördern damit ebenfalls das Wachstum der *Candida*-Zellen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den letzten Jahrzehnten durch den medizinischen Fortschritt, wie die Entwicklung neuer Medikamente und besserer Therapiemethoden, einerseits eine erfolgreichere Behandlung von schwer kranken Patienten möglich ist, es aber gleichzeitig auch mehr immunsupprimierte Patienten gibt. Zu letzterem hat die AIDS-Epidemie wesentlich beigetragen. Diese Entwicklung führte gleichzeitig zu einer Zunahme der Häufigkeit von *Candida*-Infektionen, wobei ein Anstieg der non-*C.albicans*-Spezies zu verzeichnen ist und veranschaulicht somit die wachsende Bedeutung der *Candida*-Mykosen im klinischen Alltag [58; 250; 35; 171; 223; 55]. Die Gattung *Candida* steht als Sepsis-Erreger in den USA inzwischen an 4. Stelle [253; 224; 181], wobei verschiedene Studien weltweit hohe Mortalitätsraten von etwa 40% belegen [224; 181; 35; 171].

1.2.1 *Candida albicans* - die medizinisch bedeutendste Art

Verschiedene Studien und Reviews belegen, dass *C. albicans* beim Nachweis von *Candida*-Infektionen am häufigsten isoliert wird [75; 61; 119; 35; 223]. Diese Spezies besitzt ein diploides Genom, sexuelle Fortpflanzungsphasen sind jedoch nicht bekannt [165; 74], so dass sie den Fungi imperfecti zugeordnet wird. Typisch für *C. albicans* ist die Fähigkeit, verschiedene morphologische Erscheinungsbilder zu haben. Sie kann in Form von Sproßzellen, echten Hyphen oder Pseudohyphen vorliegen [51; 187; 248]. Diese Fähigkeit

wird auch als Dimorphismus bezeichnet und ist ein wichtiger Virulenzfaktor [51; 164; 248] (s. Kapitel 1.3; S.6). Durch verschiedene Pathogenitätsfaktoren kann sich der opportunistische Krankheitserreger *C.albicans* im Organismus eines Wirtes ausbreiten, wenn dieser dafür prädisponiert ist (s. Kapitel 1.2; S.2).

Bei den klinischen Formen einer Infektion mit *C.albicans* kann man zwischen mukokutanen (z.B. Windeldermatitis, Vulvovaginitis, Ösophagitis) und systemischen Formen (invasive Candidiasis) unterscheiden. *Candida*-Infektionen sind die häufigsten Pilzinfektionen bei HIV-Patienten [180; 87]. Zur invasiven Candidiasis kommt es infolge einer Dissemination des Erregers über die Blutbahn, wobei die Mortalitätsraten wie bereits erwähnt bei etwa 40% liegen [58; 115; 224; 181]. Zentrale Gefäßkatheter sind ebenso wie das Krankenhauspersonal mögliche exogene Infektions- bzw. Übertragungsquellen, infolgedessen es zu nosokomialen Candidosen kommen kann [233; 25; 230; 142; 139]. Im Rahmen systemischer Candidosen ist neben der hämatogenen Dissemination auch ein isolierter Organbefall oder eine Absiedlung in mehrere Organe möglich. Dabei kann es u.a. zu Pneumonie, Peritonitis [21], Meningitis, Arthritis, aber auch zur Bildung hepatolienaler Abszesse kommen [58; 115; 171].

1.2.2 Zunehmende Bedeutung weiterer *Candida*-Arten im klinischen Alltag

Neben *C. albicans* sind andere *Candida*-Spezies als humanpathogene Erreger in den letzten Jahren zunehmend in den Blickpunkt des medizinischen Interesses gerückt. Obwohl *C. albicans* weiterhin die am häufigsten nachgewiesene *Candida*-Spezies ist, findet man in der Literatur gehäuft Berichte über systemische Infektionen, die durch andere *Candida*-Spezies verursacht werden [235; 171; 181]. Der Anteil der *C.-non-albicans*-Spezies innerhalb der humanpathogenen *Candida*-Spezies zeigt in den letzten Jahrzehnten eine deutlich steigende Tendenz. So verursachten diese von 1991-1998 35-65% aller Candidämien, im Vergleich zu 10-40% im Zeitraum von 1970-1990 [112]. Verschiedene Publikationen belegen, dass ungefähr die Hälfte aller Candidämien durch non-*C.albicans*-Spezies verursacht werden [97; 178; 34; 35], wobei insbesondere abwehrgeschwächte Patienten gefährdet sind [179; 4]. Die am häufigsten isolierten *C.-non-albicans*-Spezies sind *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei*. [112; 181]. Dabei finden sich die höchsten Mortalitätsraten bei *C.tropicalis* und *C.glabrata* (40-70%), die niedrigsten bei *C. parapsilosis* (10-15%) [112].

Als Erreger einer *Candida*-Endokarditis, die bevorzugt bei Herzklappenschäden oder nach Implantation künstlicher Herzklappen, sowie bei intravenösem Drogenabusus auftritt und mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden ist, wird gelegentlich *C. parapsilosis* gefunden [39; 62].

Andere klinische Manifestationen, die durch diese Spezies hervorgerufen werden können, sind u.a. Endophthalmitis nach Linsenimplantation und Peritonitis bei Patienten mit Peritonealdialyse [245; 186; 19; 182]. Hyperalimentation und intravasale Katheter bzw. Implantate [112; 224] sind wichtige Risikofaktoren. Letzteres ist zum Teil begründet in der Fähigkeit dieser *Candida*-Spezies zur Biofilmproduktion [209; 114]. Als Quelle disseminierter Pilzinfektionen bei Frühgeborenen auf neonatalen Intensivstationen sind immer häufiger non-*C.albicans*-Spezies, und hier insbesondere *C. parapsilosis* zu finden, wie verschiedene Arbeiten der letzten Dekade belegen [124; 110; 200; 224; 61; 127; 55; 230]. Die ESPED-Studie aus Deutschland (Jahresbericht 1999) [52] über „Systemische Infektionen durch Pilze bei Früh- und Neugeborenen“ (01.01.1998-31.12.1999) zeigte ebenfalls, dass neben *C. albicans* als häufigsten Erreger zunehmend andere *Candida*-Spezies, welche teilweise resistenter gegen die derzeit verfügbaren Antimykotika sind, nachgewiesen werden.

Jede der bereits erwähnten häufig nachgewiesenen *C.-non-albicans*-Spezies ist mit einer bestimmten Patientenpopulation und entsprechenden Risikofaktoren assoziiert [171]. Beispielsweise findet sich *C.glabrata* gehäuft bei älteren Patienten und Patienten mit soliden Tumoren [224; 223; 181], aber auch bei Diabetes-Patienten [10]. Zusätzliche Risikofaktoren stellen eine Prophylaxe mit Azolen, aber auch Harntraktkatheter und chirurgische Eingriffe dar [112]. Im Gegensatz dazu lässt sich *C.tropicalis* häufiger bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und Neutropenie isolieren [171; 224; 112].

Bereits in einem früheren Review über systemische *Candida*-Infektionen bei Krebspatienten (1952–1992) wurde deutlich, dass neben *C. albicans* als häufigster Spezies non-*C.-albicans*-Spezies einen wesentlichen Anteil von 46% in der Verursachung systemischer *Candida*-Infektionen hatten. Dabei zeigte sich eine prozentuale Verteilung auf folgende *Candida*-Spezies: 25% *C. tropicalis*, 8% *C. glabrata*, 7% *C. parapsilosis* und 4% *C. krusei* [250]. Diese vier Spezies waren, in einer prospektiven Studie der „Invasive Fungal Infection Group (IFIG) der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)“, im Kollektiv der Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen die für Candidämien überwiegenden *C.-non-albicans*-Spezies, und zusammen häufiger vertreten als *C. albicans* [235]. Dieser Trend setzte sich auch in den darauffolgenden Jahren bis zum heutigen Zeitpunkt fort [112; 223; 174]. In seltenen Fällen kann auch *C. lusitaniae* als Erreger systemischer Pilzinfektionen isoliert werden, wobei insbesondere abwehrgeschwächte Patienten gefährdet sind [236; 112].

Diese Beispiele veranschaulichen die wachsende Inzidenz und Bedeutung der *C.-non-albicans*-Spezies. Aufgrund initialer Resistenzen und rascheren Resistenzentwicklungen bei einigen dieser *Candida*-Spezies (s.Kapitel 1.6, S.11) gestaltet sich die Therapie der Patienten

häufig schwierig, so dass die Mortalität bei systemischen Infektionen, die durch einige non-*C.albicans*-Spezies verursacht werden, hoch ist [235; 52; 112; 171; 224; 35].

1.3 Pathogenitätsfaktoren von *Candida*

Zur Kolonisation und Infektion eines Wirtes durch *Candida*-Pilze spielen neben der Prädisposition des Wirtes verschiedene Pathogenitätsfaktoren eine entscheidende Rolle. Auf die wichtigsten Virulenzeigenschaften: Thermotoleranz, Adhäsion, Sekretion hydrolytischer Enzyme und Dimorphismus wird im Folgenden kurz eingegangen.

Mit der Anpassung an Temperaturen von 37°C, bei denen etwa 35% der *Candida*-Arten noch wachsen können, ist ein ebenso wichtiges Kriterium für die Kolonisation des Menschen erfüllt [216; 204], wie mit der Adaptation an Schwankungen im pH-Bereich [29].

Eine wichtige Voraussetzung oberflächliche und systemische Infektionen zu initiieren, ist die Fähigkeit von *C. albicans* zur Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen sowie an extrazelluläre Matrix [216; 150]. Verschiedene Zellwandmoleküle wie Mannoproteine und Integrin-ähnliche Proteine, aber auch Fimbrienadhäsine sind an diesem Prozess beteiligt [216; 74; 156; 150]. Ein hyphenspezifisches, an Zellwandglukane gekoppeltes Oberflächenprotein, Hwp1, fungiert dabei als Substrat wirtseigener Transglutaminase [213]. Dieses Protein ist wichtig für die Pathogenese der Candidiasis [217; 157]. Die Bedeutung dieses Proteins wurde durch Untersuchungen an Mäusen bestätigt, in denen Hwp-1 defiziente Mutanten weniger virulent waren [213; 227]. Adhäsive Funktionen werden auch der Familie der Als („agglutinin-like sequence“)-Proteine, die ebenfalls an Zellwandglukane gekoppelt sind, zugeschrieben [85]. Diese glykolisierten Oberflächenproteine zeigen Sequenzhomologien zum α -Agglutinin von *Saccharomyces cerevisiae*, einem Zelloberflächenprotein, welches bei Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielt [22]. Die Aktivierung von Hwp1 und den Als-Proteinen erfolgt spezifisch während der Hyphenbildung [22; 157]. Außerdem wurde bei *C. albicans* ein Integrin gefunden, welches C3b-Moleküle des Komplementsystems bindet [22; 216]. *C. albicans* exprimiert auch Zell-Oberflächen-Rezeptoren, die C3d-Moleküle binden [150]. Ein Zusammenballen von opsonierten und nicht opsonierten *C. albicans* Zellen mit Hilfe der Komplementrezeptoren könnte die Pilzzellen durch die Bildung von Aggregaten vor der Phagozytose schützen [150]. Der reversible Wechsel von Kolonieform und Zellmorphologie (phenotypic switching) ist ebenfalls verbunden mit Adhärenzeigenschaften, aber auch Änderungen der Antigenexpression und Gewebeaffinität [74; 29].

Weitere wichtige Pathogenitätsfaktoren von *C. albicans* sind zwei Gruppen hydrolytischer Enzyme, die sekretorischen Aspartatproteinasen (Sap) und die Phospholipasen [29]. Zwei Gene für die Phospholipase B (caPLB1 und caPLB2) wurden bereits kloniert, wobei durch Untersuchungen am Mausmodell für caPLB1 der Zusammenhang zwischen Aktivität dieses Enzyms, Gewebeinvasion und Pathogenität bei den Mäusen dargestellt wurde [66]. Die sekretorischen Aspartatproteinasen werden unter variablen Umweltbedingungen und bei verschiedenen Typen der Infektion differentiell exprimiert [160; 158; 203; 214]. Es sind derzeit 10 SAP-Gene bekannt [22; 203; 214], deren mannigfaltige Funktionen für die Virulenz von *C. albicans* bedeutend sind. Neben der Gewebeinvasion spielen sie u.a. auch für die Adhäsion, die Biofilmbildung, das phenotypic switching und den Dimorphismus eine wichtige Rolle [158; 22; 203; 191; 214]. Die Deletion verschiedener SAP-Gene führte im Tiermodell invasiver Candidiasis zu abgeschwächter Virulenz [86].

Als ein wesentlicher Virulenzfaktor wird die Fähigkeit von *C. albicans* angesehen, zwischen zwei verschiedenen Morphologieformen, einzelliger Hefeform und mehrzelliger filamentöser Form (Hyph) zu wechseln [36; 187; 107]. Dieses Phänomen wird als Dimorphismus bezeichnet [164; 248]. Der Wechsel zwischen den unterschiedlichen Wachstumsformen ist als Reaktion auf verschiedene Umweltbedingungen möglich [51; 248]. Eine Besonderheit von *C. albicans*, zu der von den *Candida*-Spezies sonst nur *C. dubliniensis* befähigt ist, ist die Bildung von Pseudohyphen [29]. Eine sehr effektive Möglichkeit der Differenzierung dieser zwei *Candida*-Spezies, ist die Fähigkeit von *C. albicans* unter spezifischen Bedingungen Chlamydosporen zu bilden [215]. Der Hyphenbildung wird eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben, da sich bei der Gewebeinvasion überwiegend diese Wachstumsform findet [74; 166]. Inzwischen wird jedoch vermutet, dass sowohl Hefe- als auch Hyphenform zur Virulenz von *C. albicans* beitragen [29]. Neben den bereits erwähnten Umweltfaktoren sind für die Initiierung des Hyphenwachstums Signaltransduktionswege erforderlich [51]. Beispiele für eine Vielzahl von Regulatoren sind in diesem Zusammenhang die Transkriptionsfaktoren Efg1 und Cph1 [51; 211; 248]. Deren Bedeutung für die Pathogenität zeigten Lo et al. in ihrer Arbeit: cph1-efg1-Defektmutanten hatten die Fähigkeit filamentösen Wachstums verloren und erwiesen sich im Tiermodell als avirulent [131].

Die intensive Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren mittels der neuen molekularbiologischen Methoden bietet möglicherweise in Zukunft auch neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antimykotika. In diesem Zusammenhang scheinen zum Beispiel die sekretorischen Aspartatproteinasen interessant zu sein [22; 202]. Es war zu beobachten, dass eine hoch aktive antiretrovirale Therapie mit Aspartatproteinaseinhibitoren in der HIV-Therapie coinzident mit einer sinkenden Anzahl an *C. albicans* Infektionen bei HIV- und

AIDS-Patienten waren [214]. Verschiedene experimentelle in vitro und in vivo Modelle zeigten einen direkten inhibitorischen Effekt der HIV-Proteaseinhibitoren in Bezug auf *C. albicans*. Aufgrund der verminderten Spezifität dieser Inhibitoren gegen die Sap besteht das Ziel darin, einen Sap-Inhibitor zu finden, der soviel sekretorische Aspartatproteinasen wie möglich hemmt und gleichzeitig in vivo anwendbar ist [214]. Staib et al. zeigten in Ihrer Arbeit, dass der Aspartat-Proteinase-Inhibitor Pepstatin unter den von Ihnen gewählten Bedingungen gegen 8 Sap wirkte, d.h. keiner der Sap exprimierenden *C. albicans* Stämme konnte wachsen [214]. Im Gegensatz dazu war es unter Verwendung der HIV-Proteaseinhibitoren Ritonavir und Saquinavir nur möglich, das Wachstum einiger Sap exprimierender *C. albicans* Stämme zu hemmen. Potente Sap-Inhibitoren sollten aufgrund der bereits erwähnten unterschiedlichen Funktionen der 10 Sap-Gene in der Pathogenese der *C. albicans* Infektionen, die Aktivität von soviel Sap wie möglich inhibieren. Staib et al. entwickelten ein Bioassay für das Screening potentieller Protease-Inhibitoren gegen 8 der 10 sekretorischen Aspartatproteinasen [214]. Bis zum aktuellen Zeitpunkt konnten noch keine vielversprechenden Sap-Inhibitoren mit therapeutischem Nutzen gegen systemische *Candida*-Infektionen gefunden werden [214].

In dieser Hinsicht vielversprechend sind jedoch die Ergebnisse von Falkensammler et al.. Ihre Untersuchungen zeigten eine Hemmung der *C. albicans* Adhäsion an epitheliale und endotheliale Zellen sowie eine verminderte Sap-Freisetzung durch die Protease-Inhibitoren Aureoquinon und Laccaridiones A und B, welche aus Basidiomyceten-Kulturen isoliert worden waren. Insbesondere Laccaridiones B scheint als eine mögliche neue Art von Antimykotika mit einer gezielten Wirkung gegen Pathogenitätsfaktoren der Hefe erfolgversprechend zu sein [54].

1.4 Diagnostik von *Candida*-Infektionen

Der Nachweis von *Candida*-Infektionen ist durch verschiedene Methoden möglich. Für den kulturellen Nachweis werden spezielle Nährböden wie Sabouraud-Agar, auf dem *C. albicans* in porzellanartigen, weißen Kolonien wächst, verwendet [206]. Die spezielle Fähigkeit von *C. albicans* Chlamydosporen und Keimschläuche (Pseudohyphen) auszubilden wird zur Differenzierung von anderen *Candida*-Arten genutzt [171; 248]. Eine neu entwickelte Peptidnukleinsäure-Fluoreszenzinsituhybridierungs (PNA-FISH)-Methode ermöglicht im Vergleich zur Keimschlauchbildung eine schnellere Differenzierung von *C. albicans* und *C.-non-albicans*-Spezies [249]. Die Ergebnisse von Trnovsky et al. [225] belegen, dass mit dieser Methode, im Vergleich zu kommerziell erhältlichen automatischen

Identifizierungssystemen (z.B. Api *Candida* oder Vitek von bioMérieux), eine deutlich raschere Identifizierung (1h gegenüber 24-48 h) von *C. albicans* möglich ist. Die *Candida*-Spezies lassen sich auch biochemisch durch Auswertung unterschiedlicher Assimilationsprofile unterscheiden [171; 219]. Andere Möglichkeiten des Pilznachweises sind neben der Mikroskopie histologische Methoden wie der Nachweis von *Candida* in Gewebeschnitten mittels Perjodsäure-Schiff-(PAS)-Färbung [82].

Der Nachweis einer systemischen *Candida*-Infektion gestaltet sich trotzdem relativ schwierig, weil einerseits die klinischen Zeichen unspezifisch sind und andererseits der Nachweis der Hefezellen aus der Blutkultur oft nicht gelingt. Auch bei disseminierter invasiver Candidose, beispielsweise bei abwehrgeschwächten Patienten, sind die Blutkulturen in über 50 % negativ [84; 130; 120]. Der Versuch der Diagnostik durch Antigen- sowie Antikörpernachweis über serologische Methoden zeigt wegen zu geringer Sensitivität und Spezifität noch eingeschränkten Erfolg [193; 239], daher sind diese Methoden für den routinemäßigen Einsatz noch nicht geeignet [193]. Möglicherweise bietet die Detektion von Antikörpern gegen verschiedene *Candida*-Antigene unter Verwendung neuer molekularbiologischer Techniken in der Produktion rekombinanter Antigene weitere Fortschritte in der serologischen Diagnostik [120]. Darüber hinaus sind aktuell verschiedene Assays zum Nachweis löslicher Antigene gegen drei Hauptbestandteile der Hefepilzzellwand: Galactomannan, Mannan und β -1,3-Glucan in der Diagnostik invasiver Candidosen in der Testung [101; 208]. Dennoch kann in vielen Fällen eine invasive Candidiasis erst bei der Autopsie diagnostiziert werden [239; 130]. Durch die Einführung molekulartechnischer Methoden besteht ein enormes Potential zur Verbesserung der zügigen Diagnosestellung invasiver Mykosen und zur Differenzierung der Pilz-Spezies. Seit einigen Jahren befinden sich eine Vielzahl von verschiedenen PCR-Assays in der Entwicklung und Testung [73; 226; 104; 32; 47; 147; 201; 212; 237]. Desweiteren sind neue „PCR-freie“ molekulartechnische Methoden wie z.B. die Loop-mediated isothermale DNA-Amplifikation (LAMP) entwickelt worden [88]. Deren Nutzen zur effizienten Identifizierung klinisch relevanter *Candida*-Spezies wird derzeit ebenso untersucht, wie die Immunoblot-Analyse [41].

Eine Reduktion der zur Diagnostik invasiver *Candida*-Infektionen benötigten Zeit resultiert in einem schnelleren Beginn einer gezielten antimykotischen Therapie und damit in besseren Überlebenschancen für die betroffenen Patienten.

1.5 Aufbau der Pilzzellwand und ihre Bedeutung für die antimykotische Therapie

Die derzeit am häufigsten verwendeten Gruppen antimykotischer Medikamente, Polyene und Azole, entfalten ihre Wirkung durch unterschiedliche Beeinflussung der Zellmembran der Pilze (s. Kapitel 1.6; S. 11). Eine im Vergleich dazu neue Zielstruktur für Antimykotika stellt die Pilzzellwand dar, deren Bedeutung für die Pathogenität bereits in Kapitel 1.3 dargelegt wurde [s.S.6]. Die Zellwand der Pilze ist eine dynamische Struktur, sie verändert sich beständig im Einklang mit Phasen des Zellzyklus und als Antwort auf äußere Signale [76; 105; 121; 125]. Enzyme, die in die Zellwandsynthese bei Pilzen involviert sind, wie z.B. in die Chitin- und Glucanbildung, sind Faktoren die bei Menschen nicht vorkommen [118; 116]. Die Zellwand ist essentiell, eine Hemmung der Synthese resultiert im Absterben der Pilzzelle durch Lyse [116]. Diese Tatsachen bieten nicht nur im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antimykotika, sondern auch in Bezug auf ein geringeres Potential an Nebenwirkungen und Resistenzen dieser Medikamente interessante Ansatzpunkte.

Ein Großteil der aktuellen Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau der Pilzzellwand und Funktionen der Bestandteile wurden durch Untersuchungen von *S. cerevisiae* gewonnen. Die Zellwand der Pilze besteht zu 85% aus Polysacchariden und zu 15% aus Proteinen [125]. Die Hauptkomponenten der Zellwand der Pilze sind β -1,3-Glucan, β -1,6-Glucan, Mannoproteine und eine geringe Menge Chitin [128; 26; 121; 125]. Sie zeigt eine geschichtete Struktur [125; 126]. Die innere Schicht besteht zu 80-90% aus β -1,3-Glucan-Ketten mit einigen β -1,6-Glucan-Verzweigungen, 8-18% β -1,6-Glucan-Polymeren und 1-2% Chitin. Diese Schicht ist hauptsächlich für die Elastizität und Stabilität der Zellwand verantwortlich, vor allem bedingt durch die Struktur des β -1,3-Glucans [126; 125]. Dieses essentielle Polymer bildet eine Fibrille, welche aus drei helical verschränkten linearen Polysacchariden zusammengesetzt ist [116]. Das glykosidisch mit nicht-reduzierten Ästen von β -1,3- und β -1,6-Glucan verbundene Chitin ist wichtig für die Unlöslichkeit der Fibrillen [128]. Einen Schutz vor dem Abbau durch Enzyme bietet die äußere Schicht, die aus einem Netzwerk glykolisierter Mannoproteine zusammengesetzt ist [126; 125]. Die Verknüpfung der Komponenten beider Schichten erfolgt durch das β -1,6-Glucan [128]. In dem Review von Lipke und Ovalle [128] wurde die Zellwand als ein Gitternetzwerk bezeichnet. Das Gitter ist eine Zusammensetzung einzelner Bauteile, jedes um ein β -1,3-Glucan-Molekül angeordnet. In der Abb. 1-1 wird dieses Modell schematisch veranschaulicht. Es finden sich nicht-kovalente Verbindungen in der Glucan-Chitin-Schicht und kovalente Vernetzungen in der äußeren Schicht sowie Disulfidbrücken zwischen den Mannoproteinen [128].

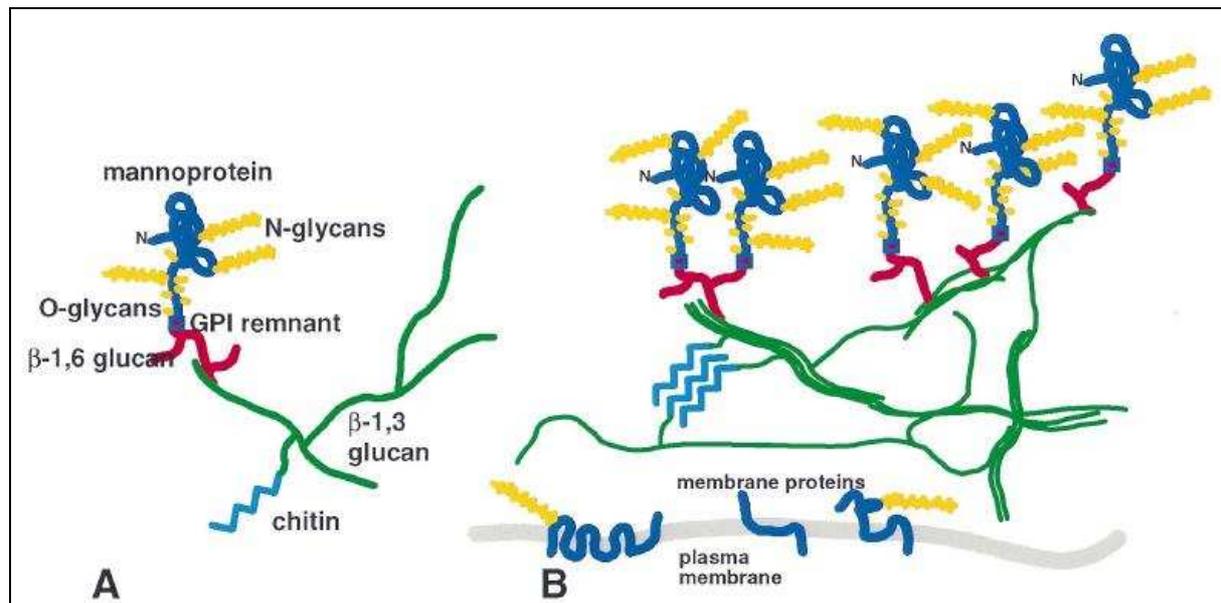


Abb. 1-1: Beziehung zwischen den Hauptkomponenten der Zellwand bei *S. cerevisiae*

(A) Prototypisches Bauelement mit individueller, farbiger Kennzeichnung. Die Mannoproteinpolypeptide sind blau, Oligosaccharide in gelb, gekennzeichnet mit N- oder O-Verbindung. Von den Verzweigungsstellen der Glucane sind nur einige dargestellt. (B) Vereinigung von Bauelementen, die ein Zellwandgitter bilden. Die Farben sind identisch zu A. Die β -1,3-Glucanketten sind zur Kennzeichnung der Tripplehelix verknötet und Chitin ist als kristalline Mikrodomäne dargestellt. Die Verknüpfung der Mannoproteine durch Disulfide und andere Brücken wird nicht abgebildet [Abb. aus 128].

Die Synthese des β -Glucans aus UDP-Glucose erfolgt durch die membranständige β -1,3-Glucan-Synthetase [116]. Im Kapitel 1.8 [s.S.20] werden der Aufbau, die Bedeutung und Regulation dieses Enzyms näher erläutert. Eine neuere Substanzklasse, die ihre antimykotische Wirkung durch die Hemmung der β -1,3-Glucan-Synthetase entfaltet, sind die Echinocandine [116]. Auch die Chitinsynthetasen sind membranständige Enzyme, ein Inhibitor dieser Enzyme ist das Nikkomycin [65; 192]. Es ist zu erwarten, dass die Echinocandine auch in Zukunft in der antimykotischen Therapie sowohl von invasiven Candidosen, als auch von Aspergillosen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

1.6 Therapie von *Candida*-Infektionen und Resistenzentwicklung

Mit der zunehmenden Anzahl an immunsupprimierten Patienten und der Einführung neuer Therapiemethoden kam es auch zu einem Anstieg an lebensbedrohlichen Pilzinfektionen [67;

80]. Problematisch war außerdem die Zunahme an Resistenzen gegen die verfügbaren Antimykotika [152]. Diese Entwicklungen förderten den Wunsch zur Etablierung neuer Medikamente, insbesondere gegen die häufig tödlich verlaufenden invasiven Mykosen wie die Candidiasis [67]. Dies erforderte gleichzeitig die Suche nach neuen Zielstrukturen für Antimykotika, die für das Überleben des Pilzes essentiell sind, wie z.B. die Zellwand [s. Kapitel 1.5, S.10].

Zwei Hauptgruppen der Antimykotika, Polyene und Azole, haben ebenso wie die Allylamine die Zellmembran als Zielstruktur. Das einzige systemisch einsetzbare Polyen ist Amphotericin B [64], das für fast 30 Jahre das einzige verfügbare Antimykotikum in der Therapie systemischer Mykosen war [67; 129]. Der Wirkmechanismus dieser Substanzklasse beruht auf einer Bindung an das Sterol/Ergosterol der Zellmembran, wodurch es zur Porenbildung kommt. Die daraus resultierende Permeabilitätserhöhung der Zellmembran führt zum Zelltod [67; 133; 182; 30]. Sekundäre Resistenzen gegen Amphotericin B oder das zur lokalen Therapie verwendete Nystatin sind selten [67; 247; 152; 133], einige Spezies wie *C. lusitaniae* und *C. guilliermondii* sind jedoch primär resistent gegen Amphotericin B [247; 133]. Der Mechanismus der Polyenresistenz bei *Candida* scheint mit einer Reduktion des Ergosterolgehaltes einherzugehen [175]. Ein Problem, das oft eine Nutzen-Risiko-Abwägung erfordert, sind die durch Amphotericin B verursachten Nebenwirkungen, vor allem die Nephrotoxizität [64; 251]. Durch den Einsatz der neueren, aber deutlich kostenintensiveren liposomalen Amphotericin B-Zubereitungen konnte die Nephrotoxizität, bei vergleichbarer Wirksamkeit, reduziert werden [241; 129].

Ein Meilenstein in der Therapie von Pilzinfektionen war die Einführung der Imidazole (z.B. Ketoconazol) und Triazole (z.B. Fluconazol) [67]. Sie hemmen die Ergosterolsynthese durch Blockierung des Cytochrom-P450 abhängigen Enzyms 14 α -Demethylase [67; 64; 182]. Die Folge ist eine Akkumulation toxischer Ergosterolvorstufen, Verminderung an Ergosterol mit resultierender Störung der Membranstruktur und Inhibition einiger membrangebundener Enzyme [67; 64; 30]. Alle Azole inhibieren verschiedene Cytochrom-P450-Enzyme, diese Interaktion ist bei gleichzeitiger Gabe anderer Medikamente, wie z.B. Calciumantagonisten oder Immunsuppressiva, zu berücksichtigen [129]. Durch eine Interaktion mit humanen Cytochrom-P450-Enzymen der Cholesterolsynthese kann es jedoch auch zu endokrinen Nebenwirkungen kommen, die besonders bei Ketoconazol ausgeprägt sind [64; 67]. Durch den weit verbreiteten und, insbesondere bei HIV-Patienten, langdauernden Einsatz der Azole kam es in den 90iger Jahren zu einer Häufung von Infektionen durch Azol-resistente *Candida*-Stämme [64; 247; 75; 133; 199] und zu einer Selektion von *Candida*-Spezies mit intrinsischer Resistenz gegen Fluconazol wie *C. krusei* und *C. glabrata* [75; 199; 35]. Der

erfolgreiche Einsatz der antiretroviralen Therapie bei den HIV-Patienten resultierte dann in einer sinkenden Inzidenz oraler Candidosen und Azol-resistenter *Candida*-Stämme [199; 80]. Fluconazol wird von der Substanzgruppe der Azole am häufigsten gegen *Candida*-Infektionen eingesetzt [153], wobei *C. albicans* normalerweise sensibel ist [247]. Untersuchungen zeigen jedoch, dass zunächst sensible *C. albicans*-Stämme unter der Therapie resistent werden können [152]. Inzwischen sind verschiedene zur Resistenz führende Mechanismen identifiziert worden [153; 67; 175; 247; 182; 30]. Kurz zusammengefasst gibt es vier wesentliche Mechanismen: Hochregulation von Multidrug Efflux Transporter Genen (ABC Transporter Gene und Major Facilitator Gen); Aminosäuresubstitution im Erg11p Protein, welches die Zielstruktur der Azole darstellt, weniger auch eine Hochregulation des ERG11Gens und Veränderungen in der Sterolzusammensetzung durch eine fehlende Aktivität der Steroldesaturase, die durch das Erg3 Gen kodiert wird [199; 133; 182]. Voriconazol, ein neuerer Vertreter der Triazole, hat ein breites Wirkungsspektrum, das sowohl *Candida* als auch *Aspergillus* einschließt [242; 78]. Es ist in Europa u.a. zur Behandlung schwerer, Fluconazol-resistenter *Candida*-Infektionen zugelassen [143; 170]. Im November 2006 wurde die Zulassung des jüngsten Vertreters, Posaconazol, von der Europäischen Kommission erweitert, es ist nun auch zur Prophylaxe und First-Line-Therapie bei oropharyngealen Candidosen zugelassen [1]. In Europäischen Studien zeigte die große Mehrheit der *Candida*-Isolate eine hohe Sensibilität gegen die beiden neuesten Azole [223]. Die Untersuchungen von Bedini et al. konnten darüber hinaus die Wirksamkeit von Posaconazol gegen *C. krusei* Stämme mit reduzierter Empfindlichkeit gegen Fluconazol und Itraconazol belegen [16].

Die Allylamine mit ihrem Hauptvertreter Terbinafin greifen ebenfalls in die Ergosterolbiosynthese ein, ihre Zielstruktur ist die Squalenepoxidase. Sie werden in der Behandlung von Infektionen durch Dermatophyten eingesetzt. Resistenzen sind beim Menschen bisher nicht bekannt [64; 67].

Einen völlig anderen Wirkmechanismus hat das 5-Flucytosin, ein Pyrimidin-Analogon mit fungistatischer Wirkung. Nach Aufnahme in die Zelle durch die Cytosin-Permease wird es in 5-Fluoruracil umgewandelt und interferiert mit der Nukleinsäure- und Proteinsynthese [67; 64; 182; 133]. Bei einigen *Candida*-Spezies, u.a. *C. albicans* Serotyp B, *C. glabrata* und *C. krusei* finden sich häufig primäre Resistenzen [175]. Da es auch rasch zum Auftreten sekundärer Resistenzen kommt, wird 5-Flucytosin überwiegend in Kombination mit Amphotericin B oder Fluconazol eingesetzt. Zum Wirkspektrum zählt neben *Candida* auch *Cryptococcus neoformans*.

Die neueste Substanzklasse mit einem völlig neuem Angriffspunkt bilden die Echinocandine. Sie zählen wie die Pneumocandine zu den Lipopeptiden, die aus einem zyklischen Hexapeptid mit N-verknüpften Fettsäureseitenketten aufgebaut sind [42]. Die Echinocandine entfalten ihre antimykotische Wirkung durch nicht-kompetitive Hemmung der β -1,3-Glucan-Synthetase und stören dadurch die Zellwandbiosynthese [67; 64]. Die β -1,3-Glucan-Synthetase besteht aus zwei Komponenten, einer katalytischen Untereinheit, die ein großes intramembranäres Protein darstellt, das bei *S. cerevisiae* durch die zwei Gene FKS1 und FKS2 kodiert wird [44; 91; 145], und einer regulatorischen Komponente, die durch das RHO1-Gen verschlüsselt wird [45; 185]. Es wird vermutet, dass bei *C. albicans* CaFks1p das Target der Echinocandine ist [43; 99], auch wenn es bisher keine Berichte über eine direkte Interaktion zwischen einem Inhibitor der β -1,3-Glucan-Synthetase und einem Fks-Protein gibt [42; 176]. Unterstützt wird diese Vermutung jedoch durch die Arbeit von Park et al., sie zeigten, dass fks1-Mutationen bei *C. albicans* zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber dem Echinocandin Caspofungin führt [173]. Möglicherweise spielen aber auch andere mit der β -1,3-Glucan-Synthetase assoziierte Proteine wie Pil1 und Lsp1 eine Rolle als Zielstruktur der Echinocandine [48]. Da es beim Menschen für die Zielstruktur der Echinocandine keine Analoga gibt, ist eine gute Wirksamkeit bei nur geringen Nebenwirkungen zu erwarten [83].

Mit Caspofungin wurde der erste Vertreter dieser Substanzgruppe am 24. Oktober 2001 von der EMA zugelassen. Die Zulassung bestand zunächst für die Behandlung Erwachsener mit invasiven Aspergillosen, die auf Therapien mit Amphotericin B, Lipidformulierungen von Amphotericin B und/oder Itraconazol nicht ansprechen oder diese nicht vertragen. Im Februar 2003 wurde auch die Genehmigung zur Behandlung der invasiven Candidiasis bei Erwachsenen ohne Neutropenie und im Mai 2004 außerdem zur empirischen Therapie bei erwachsenen Patienten mit Fieber und Neutropenie und dem Verdacht auf Pilzinfektionen zugelassen [3]. Caspofungin zeigt keine signifikante Wirksamkeit gegen *Cryptococcus neoformans* [31] oder andere filamentöse Pilze als *Aspergillus* [170]. Verschiedene Studien belegen eine ebenso gute Wirksamkeit von Caspofungin im Vergleich zu Amphotericin B und Fluconazol in der Therapie der oropharyngealen und ösophagealen Candidiasis [232, 5; 170]. Mora-Duarte et al. [151] zeigten in ihrer großen multizentrischen, randomisierten Doppelblindstudie eine gute Wirksamkeit von Caspofungin in der Primärtherapie invasiver *Candida*-Infektionen und eine geringere Nebenwirkungsrate als Amphotericin B. Weitere Studien bestätigen die gute Verträglichkeit dieses Medikamentes [243; 31; 123]. Von Bedeutung ist auch die gute Wirksamkeit von Caspofungin gegen Azol-resistente *Candida*, so dass es hierfür eine therapeutische Option darstellt [9, 152; 181; 170; 80]. Für Patienten unter 18 Jahren ist Caspofungin nicht zugelassen, verschiedene Studien und Fallberichte zeigen jedoch auch für Kinder eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit in der Behandlung

invasiver Pilzinfektionen [71; 146; 123]. Für *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* und *C. krusei* Isolate wurden vereinzelt Resistenzen gegen Echinocandine beschrieben [79; 154; 113; 11]. Insgesamt gibt es bisher jedoch nur relativ wenig klinische Resistenzen gegen Echinocandine [80; 30; 122]. Es scheint so, dass die Resistenzen gegen Echinocandine assoziiert sind mit Mutationen in zwei hoch konservierten Regionen des Fks1 Proteins, die als „Hot Spot 1 bzw. 2“ bezeichnet werden [176; 99; 173]. Eine ganz aktuelle Arbeit von Walker et al. beschreibt einen weiteren potentiellen Resistenzmechanismus der Echinocandine: die Therapie von *C. albicans* Infektionen mit niedrigen Echinocandindosen resultiert in einer erhöhten Expression der Chitinsynthasegene und erhöht die Aktivität der Chitinsynthase bei gleichzeitig reduzierter Effizienz der Echinocandine [240]. In vitro Studien belegen eine geringere Empfindlichkeit von *C. parapsilosis* gegenüber Echinocandinen im Vergleich zu anderen *Candida*-Spezies, dies zeigt sich in erhöhten minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MIC) [181; 31; 37]. Inwieweit jedoch dadurch das klinische Outcome beeinflusst wird, ist bisher noch nicht bewiesen [31]. Kürzlich wurde durch die Arbeitsgruppe von Garcia-Effron et al. bewiesen, dass die geringere Empfindlichkeit von *C. parapsilosis* gegenüber Echinocandinen mit einem natürlich vorkommenden Aminosäureaustausch im „Hot Spot 1“ Bereich des Fks1 Proteins zusammenhängt [60]. Aufgrund des völlig anderen Wirkmechanismus der Echinocandine sind jedoch keine Kreuzresistenzen mit anderen Antimykotika zu erwarten [83; 177; 123]. Neuere Vertreter dieser Substanzklasse sind Micafungin und Anidulafungin, die 2005 bzw. 2006 von der FDA die Zulassung erhielten [176]. Anidulafungin ist zur Therapie ösophagealer Candidiasis, Candidämie und invasiver Candidosen zugelassen, Micafungin ebenfalls zur Behandlung ösophagealer *Candida*-Infektionen, Candidämie und invasiver Candidosen, aber auch zur Prophylaxe von *Candida*-Infektionen bei HSCT-Empfängern [129]. In randomisierten Studien konnte die Wirksamkeit beider Echinocandine bestätigt werden [100; 31], ebenso zeigte sich eine gute Verträglichkeit [111; 18; 207; 31].

Die Echinocandine bedeuten einen enormen Fortschritt in der antimykotischen Therapie und sollten Anlaß sein, Komponenten der Pilzzellwand als mögliche Targets neuer Antimykotika weiter zu erforschen. Das Protein Fks1p, die katalytische Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthetase, ist vermutlich die Zielstruktur der Echinocandine [43]. Dafür spricht auch, dass wie bereits erwähnt, Aminosäuresubstitutionen in bestimmten Bereichen des Fks1 Proteins mit einer reduzierten Echinocandin-Empfindlichkeit einhergehen [99; 11; 60; 12]. Die regulatorische Komponente der β -1,3-Glucan-Synthetase wird kodiert durch das RHO1-Gen [45; 185], die Funktion und Bedeutung der RHO-Proteine, insbesondere von Rho1p, ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

1.7 Das RHO1 - Gen und seine Bedeutung

Rho (*ras homologous*)–Proteine gehören zur weitverbreiteten Ras-Superfamilie [220] und kommen in allen eukaryotischen Zellen vor [93]. Die Ras-Superfamilie zählt zur Gruppe der kleinen GTPasen [76; 8; 53]. Sie lässt sich in fünf Hauptgruppen unterteilen, zu denen neben Rho noch Ras, Rab, Arf und Ran gehören [8; 53]. Eine Gemeinsamkeit dieser G-Proteine ist die Guaninnukleotid-bindende Domäne, die konservierte Sequenzmotive enthält, welche für die Bindung und Hydrolyse des Nukleotids erforderlich sind [229; 23]. Die G-Proteine sind an einer Vielzahl von Signaltransduktionen beteiligt und funktionieren als Regulatoren bei verschiedenen Zellvorgängen [23]. Rho Proteine wechseln periodisch zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand [93; 135]. Der Wechsel zwischen der GTP- und GDP-gebundenen Form wird durch weitere Proteine reguliert. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) steigern die intrinsische GTPase-Aktivität der G-Proteine und damit den Übergang von der GTP- zur GDP-gebundenen Form. GTP-GDP Austauschfaktoren, GEFs (GTP-GDP exchange factors), führen zur Zunahme der GTP-gebundenen Form [27; 172]. GDIs (GDP dissociation inhibitors) hemmen wahrscheinlich die spontane Aktivität und stabilisieren die inaktive Form [93; 135]. Die Rho GTPasen verrichten ihre regulatorische Funktion in der aktiven Form durch eine konformationsspezifische Interaktion mit Effektorproteinen [93]. Die Abb. 1-2 [aus 93] veranschaulicht schematisch den RHO-GTPase Zyklus.

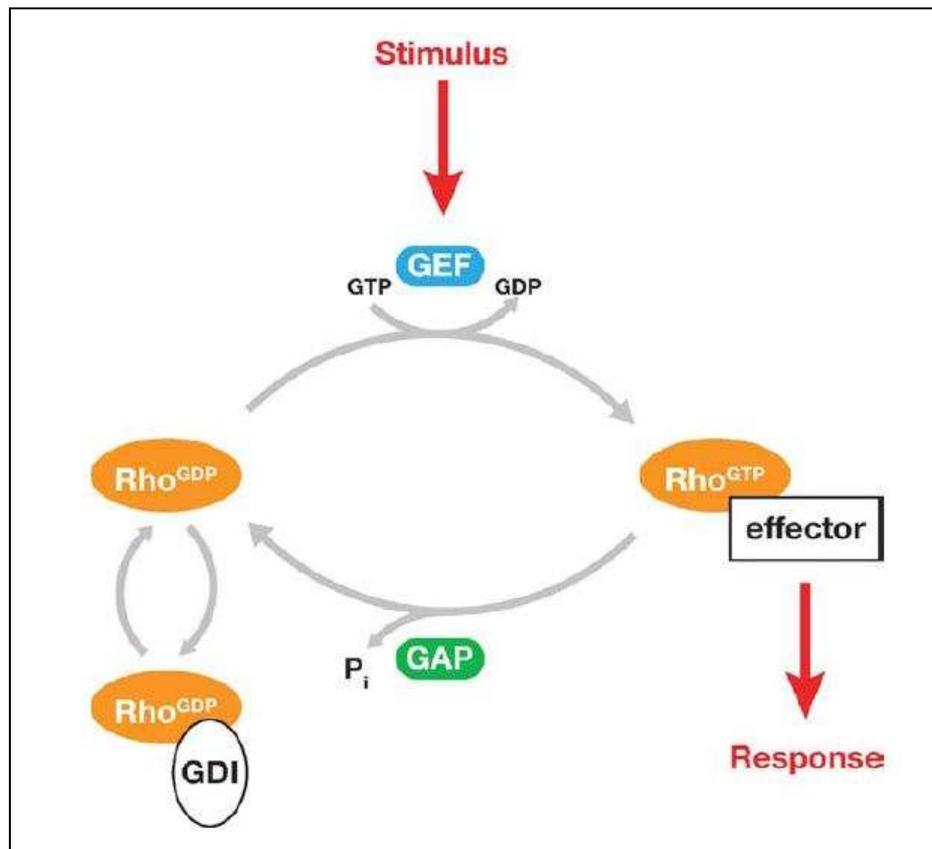


Abb. 1-2: RHO-GTPase Zyklus [Abb. aus 93]

Zu den Funktionen der Rho-GTPasen zählen u.a. die Reorganisation des Zytoskeletts, Microtubuliorganisation, Beeinflussung der Zellmorphogenese und Regulation der Zellpolarität und Zellwandsynthese [172; 93; 53]. Außerdem sind sie beteiligt an Zytokinese, Vesikeltransport und Regulation der Zellzyklusprogression sowie an Änderungen in der Genexpression, die zur Regulation verschiedener Signaltransduktionswege führen. Darüber hinaus regulieren die Rho-Proteine enzymatische Aktivitäten, beispielsweise die NADPH-Oxidase in Phagozyten und die Glucansynthetase in Hefen [93; 53]. Zugleich wird diesen GTPasen eine Rolle in der Tumorprogression zugeschrieben [194;188]. Rho-GTPasen können in die acht Untergruppen: Rho, Rac, Cdc42, RhoD, Rnd, RhoH/TTF, RhoBTB und Miro unterteilt werden. Bei Säugern sind bisher 22 kodierende Gene für Rho-GTPasen beschrieben [8].

Die kleine G-Protein Superfamilie besitzt konservierte Bereiche, wie z. B. GTP-bindende Areale, GTP-hydrolysierende Bereiche und eine „prenylation site“ [23]. Für die präzise Funktion vieler Proteine ist die posttranslationelle Modifikation wesentlich. Eine Form dieser Modifikation, die bei den Ras- und Rho-Proteinen vorkommt, ist die Proteinprenylation am C-

terminalen Ende. Diese Reaktion kann durch drei verschiedene Enzyme katalysiert werden. Die Farnesyltransferase überträgt eine C-15-Farnesylgruppe, die Geranyltransferasen Typ I (GGTase I) und Typ II (GGTase II) übertragen eine C-20-Geranylgeranylgruppe. Proteine, die durch diese Enzyme modifiziert werden, besitzen am C-terminalen Ende eine spezifische Erkennungssequenz [90]. Man nennt diese Sequenz CAAX-Box, wobei C für die Aminosäure Cystein steht, hinter A verbirgt sich in der Regel eine aliphatische Aminosäure und X kann eine beliebige Aminosäure sein. Die Farnesyltransferase modifiziert bevorzugt Proteine mit der CAAX-Sequenz, bei denen X als Abkürzung für Methionin, Serin, Cystein, Alanin oder Glutamin steht. Im Gegensatz dazu erfolgt die Prenylation durch die GGTase I bevorzugt bei Proteinen, bei denen X für Leucin steht [90; 161; 102]. Bei dem kleinen G-Protein Rho erfolgt eine posttranslationelle Geranylgeranylation des Cysteinrestes des CAAX-Motivs durch die Geranylgeranyltransferase [231; 246]. Die Prenylation ermöglicht den Rho-Proteinen die Verankerung an der inneren Seite der Plasmamembran. Außerdem ist diese posttranslationelle Modifikation für die Aktivierung der Proteine notwendig [231].

Das Rho Gen wurde erstmals 1985 in *Aplysia californica* entdeckt [136]. Später fand man Rho-Gene bei Säugetieren (RhoA, RhoB, RhoC) und bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [137; 255; 33]. Das RHO1-Protein bei Hefen ist ein Homolog des humanen RhoA. Quadota et al. zeigten, dass das RhoA bei Säugetieren in der Lage ist, einige Funktionen von RHO1 bei Hefen zu vervollständigen [184]. RhoA ist in die Aktinorganisation bei der Bildung von „stress fibers“ und fokalen Adhäsionskomplexen involviert [77]. Darüber hinaus zeigten Olson et al., dass RhoA in die Zellzyklus Progression verwickelt ist [168]. RHO-Proteine kommen außer bei Tieren und Pilzen auch in Pflanzen [252] und bei Protozoen [161] vor.

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es sechs Rho-GTPasen: RHO1, RHO2, RHO3, RHO4, RHO5 und CDC42 [126]. Rho1 ist ein bei Hefen vorkommendes multifunktionelles Protein, welches sowohl in die Regulation der Zellmorphogenese, als auch der Zellwandintegrität durch die Übertragung spezifischer Signale an verschiedene Effektorproteine involviert ist [27; 125; 172]. Es spielt eine wichtige Rolle als Regulator in der Neuorganisation des Aktinzytoskeletts und Aktinfilament-abhängiger Zellfunktionen [159; 172]. Eine wesentliche Funktion von RHO1 bei Hefen ist die Regulation der Aktivität der Proteinkinase C und folglich der damit verbundenen MAP-Kinase-Kaskade [95; 163; 172], worüber Rho1p u.a. in die Kontrolle der Zellgröße involviert ist [103]. Diese Signalkaskade gehört zu einer Reihe von Effektoren, die im „Cell Wall Integrity“ Signalweg bei *S. cerevisiae* durch Rho1 aktiviert werden [126]. Bedeutsam war auch die Identifizierung des Rho1-Proteins als mutmaßliche regulatorische Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthase bei

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida albicans* [109; 144; 45; 185; 6]. Darüber hinaus ist Rho1p in die Zellpolarisation und Zellzyklusprogression der Hefezellen involviert, wobei diese Eigenschaft unabhängig von den beiden erstgenannten Funktionen zu sein scheint [46; 172]. Ein Protein, welches in die Morphogenese der Hefen bzw. in die Neuorganisation des Aktinzytoskeletts eingebunden ist und ein „downstream“ Target von Rho1p darstellt, ist Bni1p [108; 59]. Bni1 und Bnr1 sind funktionell redundante Formin-Proteine, die für die Anordnung von Aktinkabeln benötigt werden, die wiederum als Leitstruktur für den Transport sekretorischer Vesikel in die Knospe dienen [126]. Es scheint so, dass Rho1 die Aktinpolymerisation während der Zytokinese durch Bni1/Bnr1 und während des Knospenswachstums durch Pkc1 und die MAP-Kinase-Kaskade steuert [126]. Ein weiterer Effektor von Rho1 bei *S. cerevisiae* ist der Transkriptionsfaktor Skn7, der in den „High Osmolarity Glycerol“ Signalweg involviert ist. Verschiedene Ergebnisse lassen vermuten, dass Skn7 durch Rho1 aktiviert wird, durch ihre unterschiedliche Lokalisation (Nukleus versus Zellmembran) ist der genaue Mechanismus jedoch noch unklar [126]. Der fünfte durch Rho1 regulierte Effektor Sec3 gehört zu einem „exocyst“ genannten Multiproteinkomplex, der für den Vesikeltransport benötigt wird [126; 172].

Es sind verschiedene Regulatoren von Rho1p bei *S. cerevisiae* bekannt, so beispielsweise die GAPs SAC7, BEM2, BAG7 und Lrg1, welche unterschiedliche RHO1 Funktionen kontrollieren [205; 244; 57; 172]. Rom1p und Rom2p sind GEFs die zur Aktivierung von Rho1p bei *S. cerevisiae* führen [169; 172], sie werden durch die Zelloberflächensensoren Wsc1 und Mid2 rekrutiert [126]. Ein weiterer Guanosin-Austauschfaktor ist Tus1 [126; 172]. Die Polo-ähnliche Kinase Cdc5 kontrolliert über die GEFs Tus1 und Rom2 die lokale Aktivierung von Rho1 während der Zytokinese bei Hefen [256]. Rdi1p ist ein GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI), durch den Rho1p im inaktiven GDP-gebundenen Zustand im Zytoplasma gehalten wird [106; 222], der aber auch mit den RHO-GTPasen Rho4 und Cdc42 interagiert [222].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RHO-GTPasen innerhalb verschiedenster Spezies (u.a. *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*) weit verbreitet sind. Am besten untersucht sind bisher RhoA, CDC 42 und Rac. Es besteht ein hohes Maß an Konservierung sowohl der Struktur, als auch der Funktion dieser RHO-GTPasen durch die Evolution der Eukaryoten. Darüber hinaus existieren Homologe dieser GTPasen auch bei *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* [246].

1.8 Regulation der β -1,3-Glucansynthese in der Zellwandsynthese von Hefepilzen durch das RHO1- Gen

Von den umfangreichen im vorherigen Kapitel erwähnten Funktionen von Rho1p bei Hefen liegt das Augenmerk der vorliegenden Dissertation auf der Regulation der β -1,3-Glucan-Synthase, welche eine Hauptkomponente der Pilzzellwand, das Glucan, synthetisiert [109; 144; 45; 185]. Die β -1,3-Glucan-Synthase ist aus einer mutmaßlichen katalytischen Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit zusammengesetzt. Die katalytische Untereinheit ist ein Membranprotein, das durch die zwei homologen Gene Fks1p und Fks2p verschlüsselt wird [90; 145; 44; 172]. Der gleichzeitige Defekt beider Gene wirkt letal [90; 145; 172]. Die regulatorische Untereinheit wird durch das Gen RHO1 verschlüsselt [45; 185; 121]. RHO1 reguliert Fks1p und Fks2p durch direkte Interaktion [45; 185]. Bei *S. cerevisiae* gibt es ein drittes FKS Gen, FKS3, deren Produkt zu 55% identisch mit Fks1 und Fks2 ist [125]. Funktionell scheint FKS3 während der Sporulation für den Aufbau der Sporenwand erforderlich zu sein [125; 92]. Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass die β -1,3-Glucan-Synthase-Aktivität in der Plasmamembran lokalisiert ist. Da RHO1 essentiell für die Funktion der β -1,3-Glucan-Synthase ist, müsste RHO1 ebenfalls im Bereich der Plasmamembran lokalisiert sein, wofür auch das Vorhandensein der Prenylgruppe spricht [27]. Die posttranslationelle Modifikation, d.h. die Geranylgeranylation von Rho1p, ist für die Aktivierung der β -1,3-Glucan-Synthase und die direkte Verknüpfung mit Fks1p notwendig [90; 42; 121]. Ohne diese Modifikation wird Rho1 löslich und unfähig zur Aktivierung der β -1,3-Glucan-Synthase [90]. Yamochi et al. konnten durch indirekte Fluoreszenzmikroskopiestudien zeigen, dass Rho1p bei *S. cerevisiae* im Bereich der Wachstumsseite der Hefezellen lokalisiert ist. Während der Knospenbildung befindet sich das Protein im Bereich der Knospenspitze, d.h. der Seite des polarisierten Wachstums und während der Zytokinese im Bereich des Knospenhalses, d.h. der Seite der Septumbildung [254]. Fks1p hat vermutlich die gleiche Lokalisation wie RHO1p [185]. Wie bereits zuvor erwähnt wurde, wird die Aktivität des Enzyms durch GTP oder GTP γ S stimuliert und ist abhängig von einem Guanin-nukleotid-bindenden Protein. Mazur und Baginsky zeigten in ihrer Arbeit, dass für die in vitro Aktivität der Glucansynthase bei *S. cerevisiae* Rho 1p benötigt wird [144].

In der Veröffentlichung von Kondoh und Mitarbeitern [109] konnte durch die Sequenzanalyse aufgezeigt werden, dass das RHO1-Gen bei *Candida albicans* eine 597 Nukleotide umfassende Region besitzt, welche ein etwa 22 kDa großes Peptid verschlüsselt. Die hergeleitete Aminosäuresequenz zeigt eine Übereinstimmung des *C. albicans* Rho1p mit dem Rho1p von *S. cerevisiae* von 82,9% und beinhaltet alle Domänen, die auch bei Rho-Typ GTPasen anderer Organismen vorkommen. Wie in ihrer Arbeit beschrieben wurde, ist für die

Entwicklung eines β -1,3-Glucan-Synthase-Inhibitors, der spezifisch gegen pathogene Pilze, insbesondere *C. albicans*, gerichtet ist, die Identifizierung und Charakterisierung der regulatorischen Komponente des Enzyms RHO1 in diesem Hefepilz wertvoll. Es wird die Isolierung und Charakterisierung des RHO1-Gens dargestellt. Die Identität des RHO1-Gens von *C. albicans* wurde dabei durch seine Fähigkeit bestätigt, den Wachstumsdefekt einer *S. cerevisiae* Rho1 Deletionsmutante zu vervollständigen. Durch die Experimente von Kondoh et al. [109] konnte außerdem festgestellt werden, dass eine mit Tergitol NP-40-NaCl behandelte Membran von *C. albicans* fast keine β -1,3-Glucan-Synthetase-Aktivität mehr zeigte, die Aktivität in der gewaschenen Membran aber durch die Zugabe von rekombinanten *C. albicans* Rho1p wiederhergestellt werden konnte, wenn GTP γ S vorhanden war. In der Abwesenheit von GTP γ S war das nicht der Fall. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Rho1p von *C. albicans* die Enzymaktivität von behandelten *S. cerevisiae*-Membranen wiederherstellen konnte. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass das geklonte Genprodukt als Regulatorprotein der β -1,3-Glucan-Synthetase sowohl in vivo als auch in vitro wirken kann. RHO1p ist für das Wachstum und die Lebensfähigkeit von *C. albicans* in vivo und in vitro essentiell [210].

Auch durch die Arbeit von Drgonova et al. [45] wurde das GTP-bindende Protein, das für die Aktivität der 1,3- β -Glucan-Synthase benötigt wird, als Rho1p identifiziert. Sie zeigten außerdem, dass Rho1p eine Proteinkinase C steuert, welche eine mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade kontrolliert. Ihre Experimente ergaben, dass beide Effekte von Rho1p unabhängig voneinander sind. Gleichzeitig publizierten Qadota et al. [185] ihre Ergebnisse, mit denen ebenfalls Rho1p als regulatorische Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthase nachgewiesen wurde. Sie stellten fest, dass die Aktivität dieses Enzyms funktionsfähiges Rho1p in GTP-gebundenem Zustand benötigt. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass auch die β -1,6-Glucan-Synthase durch Rho1 kontrolliert wird [234; 125; 172].

Homologe des RHO1-Gens von *Saccharomyces cerevisiae* konnten außer bei *Candida albicans* [144] auch bei weiteren Sprosspilzen wie *Schizosaccharomyces pombe* [159], *Cryptococcus neoformans* [221], dem Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* [14] und dem Zygomyceten *Mucor rouxii* [7], aber auch bei dem Protozoon *Trypanosoma cruzi* [161; 38], sowie dem Parasiten *Schistosoma mansoni* [231] identifiziert werden.

1.9 Fragestellung

In den vorangegangenen Abschnitten wurde an verschiedenen Beispielen die zunehmende Bedeutung der Gattung *Candida* im klinischen Alltag beschrieben (s.1.2). Die bisherigen Untersuchungen über RHO1 bei den Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* (s. 1.7;1.8) zeigen, welche wesentliche Bedeutung dieses multifunktionelle Protein u.a. für die Regulation der β -1,3-Glucan-Synthase, aber auch für die Übertragung spezifischer Signale an verschiedenste Effektorproteine hat.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, zunächst das Vorkommen des RHO1-Gens bei *C. albicans* mittels PCR und Gelelektrophorese nachzuweisen. Dazu sollte eine Optimierung der PCR der *Candida*-DNA bezüglich der Auswahl der geeignetsten Primer und Polymerasen erfolgen. Des Weiteren sollte mit Hilfe speziell ausgesuchter Restriktionsenzyme geprüft werden, ob bei vorhandenen RHO1-Genen bei *C. albicans* Mikroheterogenitäten existieren. Darüber hinaus sollten mit denselben Methoden andere *Candida*-Spezies auf das Vorkommen des RHO1-Gens untersucht werden. Sollte dies gelingen, war geplant, mit Hilfe einer Sequenzanalyse die durch das Gen kodierten Aminosäuresequenzen zu vergleichen.

Diese Untersuchungen sind interessant im Hinblick auf die Überlegung, ob das RHO1-Gen bzw. durch dasselbe gesteuerte Eigenschaften bei *Candida* oder anderen Mikroorganismen potentielle Ziele für die Entwicklung neuer Antimykotika sein könnten. Untermuert werden diese Überlegungen durch Literaturdaten, die die katalytische Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthase, Fks1p, als wahrscheinliches Target der Echinocandine beschreiben [43; 60]. Da diese Substanzgruppe seit einiger Zeit erfolgreich in der Therapie von *Candida*-Infektionen verwendet wird, könnte auch die regulatorische Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthase, Rho1p, eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung weiterer Antimykotika darstellen. Dazu wäre es in weiteren Untersuchungen erforderlich, zu überprüfen, ob die Funktion von RHO1 als regulatorische Komponente der β -1,3-Glucan-Synthase inhibiert werden kann, ohne gleichzeitig die Funktionen des RHO1-Homologs beim Menschen, RHOA, zu beeinflussen. Die vorliegende Dissertation soll jedoch zunächst einen Beitrag bezüglich des Vorkommens des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida*-Spezies im Hinblick auf diesen möglichen Nutzen leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pilzstämme

Für die durchzuführenden Untersuchungen wurden die in der nachfolgenden Tab. 2-1 (S.23) aufgeführten Stämme eingesetzt. Bei der Stamm-Nummer handelt es sich um eine laborinterne Nummerierung von Patientenstämmen des mykologischen Labors des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene der Charité. Für die Vergleichsuntersuchungen wurden die DSM- bzw. ATCC-Stämme der genannten Arten aus der Stammsammlung des Institutes verwendet.

Tab. 2-1: Pilzstämme

Spezies	Stammnummern
<i>Candida albicans</i>	P 9484, Pat.x, 10269, P 10269, B 10433, S 110, S 127, S 128; S 139, S 125, S 126, S 121, S 130, S 137, 5535, 5442, 5423, 5417, 5510, 5468, 5495, 5553, 5469, 5466, 5554, 5563, 5538, 5562, 5560, 5569, 5551, 5461, 5484, 5588, 5575
<i>Candida guilliermondii</i>	DSM* 6381
<i>Candida norvegiensis</i>	DSM 70760
<i>Candida sake</i>	DSM 70763
<i>Candida lusitanae</i>	DSM 70102, S 10, S 46, S 69, S 73
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC** 90018, S 12, S 19, S 44, S 57, S 80
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030
<i>Candida inconspicua</i>	DSM 70631
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Trichosporon mucoides</i>	ATCC 201383
<i>Candida kefyr</i>	ATCC 4135
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 201381, S 13, S 14, S 18, S 45, S 50, S 51, S 56, S 79, S 83, S 93
<i>Candida magnoliae</i>	ATCC 201379

* DSM - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; ** ATCC - American Type Culture Collection; bei den übrigen Stamm-Nummern handelt es sich um eine laborinterne Nummerierung.

2.1.2 Geräte

In der folgenden Tab. 2-2 (S.24) sind die zur Bearbeitung der Aufgabenstellung verwendeten Geräte aufgelistet. Ihre qualitätsgerechte Nutzung wurde durch eine Einweisung vor Beginn

der Experimente und anhand von Gerätejournalen gewährleistet. Die regelmäßige Wartung wurde durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité sichergestellt.

Tab. 2-2: Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug sowie Säuren- und Laugenschrank	Köttermann
Beater Bio 101 (FastPrep FP 120)	Savant
Brutschrank BB 16	Heraeus
Brutschrank Modell 200	Memmert
IBM Computer Pentium I	
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Eagle Eye II Still Video System	Stratagene
Elektrophoresezubehör: Mini-Gel Electrophoresis Unit Mupid®-2	Eurogentec
Fireboy plus	Integra Biosciences
Inkubator 1000	Heidolph
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Kühlschrank - 20°C	Liebherr
Kühlzentrifuge eppendorf centrifuge 5402	Eppendorf
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte MR 3001	Heidolph
Metallblock Thermostat Techne-Dri-Block®DB-2A (Wärmeblock)	thermo-Dux
Mikroskop TELAVAL 31	Carl Zeiss Jena
Mikrowelle DAEWOO	unbekannt
Parafilm-Spender: Parafilm®M Cutter	Brand
Photometer (Bakterien/Pilze) SPECTRONIC®20+ series	Spectronic
Photometer (DNA/Proteine) Ultrospec®III (Spektralphotometer)	Pharmacia
Pipetten	Eppendorf, Labsystems
Schüttler Unimax 1010 (Kombination mit Inkubator)	Heidolph
Tischzentrifuge: centrifuge 5415 C	Eppendorf
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph
Waage LC 6201	Sartorius

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die in der folgenden Übersicht dargestellten Materialien wurden zur Durchführung der Experimente eingesetzt. Die Lagerung der Substanzen erfolgte entsprechend den Angaben

des Herstellers bzw. der Gebrauchsanleitung bei Raumtemperatur, im Kühlschrank bei 4°C oder -20°C bzw. im Säuren - und Laugenschrank.

2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen

Tab. 2-3: Chemikalien und Lösungen

Chemikalien, Lösungen	Hersteller
Agarose NEEO	Carl Roth GmbH
Aqua bidest., Ecotainer®Aqua	B. Braun
Chloroform, reinst	Carl Roth GmbH
Ethanol, reinst	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Glycerol, wasserfrei	Fluka Chemie AG
Mineralöl	SIGMA-ALDRICH Chemie
Natriumacetat, wasserfrei, 3M, pH 5,2	Merck
Phenol, Roti® Merck -Phenol	Carl Roth GmbH
Phenol-Chloroform, Roti®-Phenol/Chloroform	Carl Roth GmbH
Tween 20	unbekannt

2.1.3.2 Enzyme, Puffer und Reagenzien (Fertiglösungen)

Tab. 2-4: Enzyme, Puffer und Reagenzien

Enzyme, Puffer, Reagenzien		Hersteller
BSA (Bovine Serum Albumin), 20mg/ml		MBI Fermentas
dNTP Set (je 100mM Lösungen von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		MBI Fermentas
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, SM0241		MBI Fermentas
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, SM0311		MBI Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, SM0331		MBI Fermentas
MgCl ₂ , 25mM		MBI Fermentas
Nährmedium: Sabouraud-Bouillon		Sifin
QIAquick PCR Purifikation Kit		QIAGEN
Puffer PB (für QIAquick Kit)		QIAGEN
Puffer PE (für QIAquick Kit)		QIAGEN
Puffer EB (für QIAquick Kit)		QIAGEN
Restriktionsenzyme:	Cfr10I (10U/μl) + 10x Buffer Cfr10I	MBI Fermentas
	BseNI (10U/μl) + 10x Buffer B ⁺	
	EcoRI (10U/μl) + 10x Buffer EcoRI	
	HpaII (10U/μl) + 10x Buffer Y ⁺ /Tango™	
	PstI (10U/μl) + 10x Buffer 0 ⁺	
	RsaI (10U/μl) + 10x Buffer y ⁺ /Tango™	
	VspI (10U/μl) + 10x Buffer 0 ⁺	
Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)		MBI Fermentas
Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)		Appligene
SAWADY - Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)		Peqlab
Amplitaq - Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)		Perkin Elmer

2.1.3.3 Oligonukleotide

Die als PCR-Primer benötigten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG oder EUROGENTEC synthetisiert. Zur Herstellung einer Stammlösung wurden die Oligonukleotide in modifiziertem TE (1x) aufgenommen und auf eine Konzentration von 250 μM eingestellt. Von dieser Stammlösung wurde dann eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 50 μM hergestellt.

In der Tab. 2-5 (S.27) sind die ausgewählten Primer-Paare mit der jeweiligen Nukleotidsequenz und der berechneten Schmelztemperatur T_m aufgeführt.

Tab. 2-5: Oligonukleotide

Nr.	Name	Nukleotidsequenz	T_m °C
1/2	canrho1-5f	5` - ATG GTT AAC GGT CCA GCT GAA CTT CGT A - 3`	65,1
	canrho 1-3r	5` - GTT GTT GTT ACA TTT ACA AGA CAA CAC A - 3`	59,3
3/4	grl5	5` - GAA GAA TTC ATG AAA ATT GTC GTT GTC GGT G - 3`	59,6
	grl3.rev	5` - TTG ACT GCA GCT ACA ATA TTA CAC ACT TTT T - 3`	56,9
153/154	153-pilz-pcr-5	5` - ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG - 3`	59,4
	154-pilz-pcr-3	5` - CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG - 3`	61,4

Formel zur Berechnung von T_m : $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G + C) + 16,6 \log [Na^+] - 500/n$. $[Na^+] =$ Molarität von Natrium = 0,05 mol/l; $n =$ Anzahl der Basen im Oligonukleotid; $(\%G+C) =$ gemeinsamer Anteil an Guanosin und Cytosin am Oligonukleotid in Prozent.

2.1.3.4 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Tab. 2-6: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
50x TAE	2M Tris; 1M Essigsäure 100%; 0,05M EDTA pH 8,0
1xTE	1mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH 8,0
1x TE modifiziert	0,1mM EDTA; 10mM Tris-HCl pH 8,0
Ethidiumbromid	0,5µg/ml in Wasser
6x Loading Buffer	30% Glycerol; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF

2.1.3.5 Weitere Verbrauchsmaterialien

Tab. 2-7: Weitere Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser 22x22mm	Menzel-Gläser
Objektträger	Menzel-Gläser
Zählkammer Neubauer	Brand
Parafilm „M“®	American National Can™

2.1.4 Spezielle Software

- Bildbearbeitungsprogramme: Corel Photo Paint 8; Slow View; Adobe Photo Shop
- Eagle-Eye-Software: Eagle Sight™ Image Capture and Analysis Software, Stratagene
- Gendatenbanken: emfun, geall, genbank
- HUSAR: Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, DKFZ Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturelle Auswahl der Stämme

Zur Prüfung des Vorhandenseins des RHO1-Gens in verschiedenen *C. albicans* Stämmen, wurden Patientenstämme des mykologischen Labors der Charité stichprobenartig ausgewählt. Die Pilzstämme waren aus unterschiedlichen Patientenmaterialien zufällig ausgewählt und isoliert worden. Von den verfügbaren Stammkulturen wurde eine Subkultur auf Sabouraud-Platten zur Überprüfung der Lebensfähigkeit der Stämme angelegt. Bei erfolgreicher Subkultivierung wurde von dieser ausgehend eine Gebrauchskultur angefertigt. Aus insgesamt 30 *C. albicans* Stämmen erfolgte dann eine „klassische“ DNA-Freisetzung (s. 2.2.3.4; S.32) mit nachfolgender Messung der DNA-Konzentration am Photometer (s. 2.2.3.7; S.33). In der Tab. 2-8 (S.28) sind die verschiedenen Stämme und das jeweilige Material, aus dem sie isoliert wurden, sowie die gemessene DNA-Konzentration aufgeführt.

Tab. 2-8: *Candida albicans* Stämme

<i>C. albicans</i> Stamm	Materialart	DNA-Konzentration in µg/µl
S 110	Sputum	0,92
S 127	Rachenabstrich	1,52
S 128	Rachenabstrich	2,0
S 139	Trachealsekret	0,88
S 125	Trachea	0,45
S 126	Bronchialsekret	0,76
S 121	Rachenabstrich	1,16
S 130	Stuhl	0,91
S 137	Katheterspitze	1,57
5535	Stuhl	0,05
5442	Rachenabstrich	0,03
5423	Rachenabstrich	0,13

5417	Rachenabstrich	0,07
5510	Urin	0,05
5468	Stuhl	0,02
5495	Sputum	0,06
5553	Stuhl	0,02
5469	Rachenabstrich	0,03
5466	Rachenabstrich	0,37
5554	Sputum	1,08
5563	Stuhl	1,29
5538	Drainage Leberabszess	1,59
5562	Sputum	0,66
5560	Pleurapunktat	0,74
5569	Vaginalabstrich	1,58
5551	Sputum	2,15
5461	Sputum	2,31
5584	Stuhl	2,53
5588	Eiter/Leberabszess	1,89
5575	Punktat/Pankreaszyste	1,34

Die nachfolgende Tab. 2-9 (S.30) stellt eine Übersicht der Stämme weiterer Spezies dar, die auf das Vorhandensein des RHO1-Gens mit den bereits beschriebenen Methoden zur DNA-Präparation (s.2.2.3.4; S.32), PCR (s.2.2.4; S.34) und Gelelektrophorese (s.2.2.5; S.37) untersucht wurden.

Tab. 2-9: Weitere *Candida*-Spezies

Spezies	Stamm-Nummer
<i>Candida guilliermondii</i>	DSM 6381
<i>Candida norvegensis</i>	DSM 70760
<i>Candida sake</i>	DSM 70763
<i>Candida lusitanae</i>	DSM 70102
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 90018
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030
<i>Candida inconspicua</i>	DSM 70631
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Trichosporon mucooides</i>	ATCC 201383
<i>Candida kefyr</i>	ATCC 4135
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 201381
<i>Candida magnoliae</i>	ATCC 201379

2.2.2 Herstellung einer Pilzkultur

Die zu untersuchenden Pilzstämmen wurden als Stammkultur auf Sabouraud-Agar-Platten oder Schrägagar zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung der Lebensfähigkeit der Stämme wurden Subkulturen auf Sabouraud-Platten angelegt, welche dann für mindestens 48 h bei 28-30°C bebrütet wurden. Bei erfolgreicher Subkultivierung wurde davon ausgehend jeweils eine Gebrauchskultur hergestellt. Dazu wurden 1-2 Kolonien des jeweiligen Stammes in 8 - 10 ml Sabouraud-Bouillon inokuliert. Die Kulturen wuchsen über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 36°C auf einem Schüttler. Bei einigen Experimenten wurde von der Übernachtsschüttelkultur eine 1:10 bzw. 1:20 Verdünnung in 8-10 ml Sabouraud-Bouillon hergestellt und diese für weitere 3-5 h bei 36°C geschüttelt, um die Pilze in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten. Außerdem wurde jeweils eine neue Stammkultur auf Schrägagar angelegt, mit Parafilm abgedichtet und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.3 DNA – Präparation

In einer Reihe von Vorversuchen wurden zwei verschiedene Varianten der DNA-Präparation verglichen: eine schnelle Form der Präparation durch Hitzeaufschluss ohne nachfolgende Reinigung der DNA und die klassische DNA-Präparation. Diese beinhaltet nach der DNA-

Präparation die Reinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation.

2.2.3.1 DNA-Präparation durch Hitzaufschluss ohne nachfolgende Aufreinigung

1 ml einer Übernachtsschüttelkultur wurde bei Raumtemperatur mit 8000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 2 ml Puffer (1x modifiziertem TE) resuspendiert. Nach Bestimmung der optischen Dichte wurden die Keimzahl berechnet und verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt. Jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen wurden für zehn Minuten bei 100°C im Wärmeblock erhitzt und danach für ca. 3 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Probe bei 4°C in der Kühlzentrifuge bei einer RZB von 15.000 g für 10 min zentrifugiert, um die DNA von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überpipettiert und bei -20°C gelagert oder für eine folgende PCR verwendet. Das Sediment wurde verworfen.

2.2.3.2 Messung der optischen Dichte der Pilzkultur

Die Messung der OD der Übernachtsschüttelkultur erfolgte am SPECTRONIC 20⁺-Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm. Der Nullabgleich des Gerätes wurde mit Sabouraud-Bouillon durchgeführt.

Unter der Annahme, dass bei der Gattung *Candida* eine OD von 1,0 einer Konzentration von 5×10^7 Pilzzellen/ml entspricht und dass zwischen der Pilzkonzentration und der OD Proportionalität besteht, konnte mit Hilfe einer Verhältnisgleichung die Keimzahl, d.h. die Konzentration der Pilzzellen in der Kultur, bestimmt werden. Ausgehend von der Stammlösung konnten mit Hilfe der Gleichung $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$ zielgerichtet weitere Verdünnungen hergestellt werden.

2.2.3.3 Quantifizierung von Zellen

Zur Quantifizierung wurden die Zellen einer Pilzkultur mikroskopisch unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Ein 16er Feld (Gruppenquadrat) enthält 4 x 4 Klein-Quadrate. Dabei hat ein Quadrat eine Grundfläche von 0,0025 mm² und eine Tiefe von 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Volumen von 0,00025 mm³ (= 0,00025 µl). Es wurden jeweils fünf 16er - Felder ausgezählt und aus dieser Zellzahl n mit Hilfe der folgenden Gleichung die

Zellzahl der Pilzkultur pro ml berechnet: $n:5:16:0,1:0,0025 = \text{Zellzahl}/\mu\text{l}$, $\text{Zellzahl}/\mu\text{l} \times 1000 = \text{Zellzahl}/\text{ml}$.

2.2.3.4 „Klassische“ - DNA-Präparation

1 ml einer Übernachtschüttelkultur wurde bei Raumtemperatur mit 8000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 400µl Puffer (1x modifiziertem TE) resuspendiert. Diese DNA-Lösung wurde in ein 2 ml-Röhrchen, das eine kleine Menge Glasperlen enthielt, überführt. Die Glasperlen dienten in der nachfolgenden Lysierung im Beater Bio 101 der gründlicheren mechanischen Zerstörung der Zellwand der Pilzzellen. Als nächster Arbeitsschritt erfolgte die Extraktion der DNA.

2.2.3.5 Phenol/Chloroform – Extraktion

Zur Abtrennung der DNA von Proteinbeimengungen und anderen Zellbestandteilen wurde eine Extraktion mit den organischen Lösungsmitteln Phenol und Chloroform durchgeführt.

In das 2 ml-Röhrchen mit der 400 µl DNA-Lösung (Ausgangsvolumen) (s. 2.2.3.4, S.32) wurden 400 µl Phenol dazugegeben und dieses Gemisch für 45 Sekunden im Beater Bio 101 (Speed 4) zur weiteren Zerstörung der Pilzzellwand und besseren DNA-Freisetzung gemischt. Da durch häufiges Pipettieren Verluste entstehen können, ist der DNA-Ansatz gegebenenfalls mit 1xTE auf 400µl aufzufüllen. Die so entstandene Emulsion wurde für 15 Minuten bei 4°C mit 15.000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, wodurch eine Trennung in zwei Phasen erfolgte. Phenol besitzt eine hydrophobe Phase, in der sich die Proteine lösen und eine hydrophile Phase, in der sich die DNA löst. Der Überstand, d. h. die wässrige Phase mit der gelösten DNA, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überpipettiert. Dazu wurde ein Volumenteil des Phenol-Chloroform-Gemisches gegeben, der Ansatz zwei Minuten geschüttelt (gevortext) und erneut für 15 Minuten bei 4°C mit 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überpipettiert und der letzte Extraktionsschritt durch Zugabe von einem Volumenteil Chloroform analog wie zuvor beschrieben, aber einer Zentrifugationszeit von 5 Minuten, durchgeführt.

Der wässrige Überstand mit der gereinigten DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses auf Eis gestellt. Anschließend folgte die Ethanolpräzipitation der DNA.

2.2.3.6 Ethanolpräzipitation

Die Ethanolpräzipitation diente zur Konzentrierung der DNA, sowie zur Entfernung von Phenolrückständen und Salzen. Zur gelösten DNA mit einem bestimmten Ausgangsvolumen (AV) wurden 1/10 AV 3M Natriumazetat (pH 5,2) und 2 AV Ethanol 100% (-20°C) hinzupipettiert und dieser Ansatz für 2 Minuten auf dem Vortexgerät gemischt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20°C.

Danach erfolgte in mehreren Arbeitsschritten das Waschen der DNA:

Das Präzipitat wurde für 30 Minuten bei -2°C mit 15.000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde vorsichtig abpipettiert und zu dem Pellet 1 ml Ethanol 70% (-20°C) dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei -2°C und 15.000g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mindestens einmal wiederholt. Der letzte Waschschritt erfolgte mit 200 µl Ethanol 100% (-20°C). Abschließend wurde das getrocknete DNA-Pellet in einem dem Versuchsansatz entsprechendem Volumen sterilem Wasser oder Puffer (modifiziertes 1x TE) resuspendiert und nach Messung der DNA-Konzentration bei -20°C gelagert.

2.2.3.7 Messen der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde am UV-Photometer (Ultrospec III) durch Messung der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:200 verdünnt, was bei der späteren Konzentrationsberechnung aus der gemessenen optischen Dichte zu berücksichtigen war. Zur Messung wurden Quarzküvetten verwendet und die DNA gegen destilliertes Wasser als Leerwert gemessen. Eine OD von 1,000 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA und einer Konzentration von 40 µg/ml Einzelstrang-DNA in Wasser. [198].

Das Verhältnis der Werte bei 260 nm (für DNA) und 280 nm (für Proteine) lässt eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäure zu. Saubere DNA- oder RNA-Präparationen haben ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0. Besteht dagegen eine Kontamination der Nukleinsäure mit Phenol oder Protein ist der Quotient aus OD 260/OD 280 signifikant niedriger [198]. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Gesamtvolumens der DNA-Präparation, abzüglich des zur Absorptionmessung eingesetzten Volumens und der Tatsache, dass eine OD von 1,000 bei 260 nm einer Lösung von 50 µg Doppelstrang-DNA pro ml entspricht [198] lässt sich die DNA-Gesamtmenge berechnen.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.4.1 Durchführung der PCR

Zur gezielten Amplifizierung des RHO1-Gens wurde ein vollautomatischer Thermocycler verwendet. Als Enzym wurde die aus *Thermus aquaticus* gewonnene Taq-DNA-Polymerase oder die gentechnisch hergestellte Amplitaq®-Polymerase eingesetzt.

Die Hersteller der eingesetzten Reagenzien sind unter 2.1.3 (S.24) aufgeführt.

Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurde stets eine Negativkontrolle, d.h. ein Ansatz nur mit den Reagenzien ohne DNA mitgeführt, um Verunreinigungen auszuschließen. Außerdem wurde eine Positivkontrolle eingesetzt, d.h. ein Reaktionsansatz mit Template-DNA, von dem bekannt war, dass der gewünschte DNA-Abschnitt amplifizierbar ist. Dies diente dem Nachweis, dass die gewählten PCR-Bedingungen eine Vervielfältigung von DNA ermöglichen.

In den Tabellen Tab. 2-10 (S.34) und Tab. 2-11 (S.35) sind die gewählten Konzentrationen der PCR-Komponenten und die durch Vorversuche geeignetesten Bedingungen für die PCR dargestellt.

Tab. 2-10: PCR-Ansatz

Reagenzien in Ausgangskonzentration	Konzentration/Menge pro Ansatz
Reaktionsvolumen	100 µl
5'Primer (forward Primer), 50 µM	25 pmol
3'Primer (reverse Primer), 50 µM	25 pmol
MgCl ₂ , 25mM	1,5 mM
dNTP - Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), jeweils 2 mM	50 µM (jeweils)
Taq - Polymerase / Amplitaq®- Polymerase, 5 U/µl	1 U
PCR-Puffer, 10x	1x (10 µl)
BSA, 20 µg/µl	0,1 µg/µl
DNA -Template	variabel
Aqua bidest	ad 100 µl
Mineralöl als Verdunstungsschutz	70 µl

Tab. 2-11: Reaktionsbedingungen für die PCR

Inkubationstemperaturen und – zeiten je Zyklus	
Denaturierung der DNA-Doppelstränge	93°C, 1 min (1. Zyklus: 2 min)
Annealing (Anlagerung der Primer)	45°C oder 40°C, 1 min
Extension (Strangverlängerung)	72°C, 1 min (letzter Zyklus: 10 min)
Nach dem letzten Zyklus Reaktionsstop, Kühlung bei 4°C	
Anzahl der Replikationszyklen	32

Die Kontrolle der PCR erfolgte mittels Elektrophorese. Die nicht in der Elektrophorese eingesetzten PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

Bevor in weiteren Experimenten das Amplikon mit Restriktionsenzymen geschnitten oder sequenziert wurde, ist eine Aufreinigung des PCR-Produktes durchgeführt worden.

Die Größe der DNA von Hefepilzen beträgt ca. $1,6 \times 10^7$ bp (Bsp.: *S. cerevisiae*). Da 1bp ein Gewicht von 660 Da hat, lässt sich für Hefepilze ein Molekulargewicht von ca. 1×10^{10} Da berechnen [198]. Mit Hilfe dieser Parameter kann die Menge an Genom berechnet werden, die sich mindestens in der PCR vervielfältigen lässt. Unter Berücksichtigung dieser Werte und der Tatsache, dass $1 \text{ mol} = 1 \times 10^{10} \text{ g}$ und $1 \text{ mol} = 6,023 \times 10^{23}$ Moleküle (Loschmidt-Zahl oder Avogadro-Konstante) kann die Nachweisgrenze der PCR bestimmt werden, bei der in der Elektrophorese noch eine Bande zu sehen ist.

2.2.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts mit Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation

Die Aufreinigung des PCR-Produkts diente der Entfernung der Polymerase, da diese die Restriktionsenzyme beziehungsweise die Sequenzierreaktion beeinflussen kann. Die Arbeitsschritte entsprechen prinzipiell der bereits dargestellten Reinigung der DNA (s. 2.2.3.5, S.32 und 2.2.3.6, S.33). Aus diesem Grunde erfolgt hier nur eine kurze Beschreibung der davon abweichenden Schritte.

Von den identischen PCR-Produkten eines Pilzstammes wurde jeweils ein Volumen von 90 - 100 µl aus dem PCR-Reaktionsgefäß in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei war zu beachten, dass das als Verdunstungsschutz hinzugefügte Öl als Rückstand im PCR-Reaktionsgefäß verbleibt. In der Regel wurden für die Experimente drei oder vier PCR-Ansätze pro Stamm realisiert, so dass ein Volumen von ca. 300-400 µl PCR-Produkt vorhanden war. Es wurde ein Volumenteil Phenol hinzugefügt und das Gemisch für 2

Minuten auf dem Vortexgerät gemixt. Die weitere Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation erfolgte wie in 2.2.3.5 (S.32) und 2.2.3.6 (S.33) beschrieben. Die Resuspension des DNA-Pellets nach der Ethanolpräzipitation erfolgte in einem dem Versuchsansatz entsprechend benötigtem Volumen Aqua bidest. Das DNA-Pellet wurde nicht in TE-Puffer resuspendiert, weil der Puffer die nachfolgende Restriktion oder Sequenzierung beeinflussen kann. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.2.4.3 Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem QIAquick PCR Purification Kit

Als weitere Variante der Reinigung ist die Nutzung des QIAquick PCR Purification Kits von QIAGEN in Anlehnung an das QIAquick-Protokoll getestet worden.

Die Methode wurde zur Reinigung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA-Fragmenten von PCRs aufgebaut. Durch Nutzung der QIAquick-Säule in einer Mikrozentrifuge können Fragmente von 100 bp bis 10 kb zum Beispiel von Primern, Polymerase und Salz gereinigt werden. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 10.000g in einer Tischzentrifuge durchgeführt.

Es wurden jeweils identische PCR-Produkte (PCR-Ansätze) von ca. 100 μl einer Pilzspezies in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Fünf Volumenteile des Puffers PB wurden zu einem Volumenteil PCR-Reaktion gegeben und gemixt. Die QIAquick-Säule wurde in ein vorbereitetes 2 ml-Reaktionsgefäß gestellt. Um die DNA an der Membran der Säule zu binden, ist das Reaktionsgemisch auf die Säule pipettiert und 30-60 Sekunden zentrifugiert worden. Der Abfall wurde nach Passage der Säule als Flüssigkeit im Reaktionsgefäß aufgefangen und verworfen. Zum Waschen der DNA wurden 0,75 ml Puffer PE auf die Säule pipettiert und 30 - 60 Sekunden zentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde wieder verworfen. Zur vollständigen Entfernung des in dem Puffer PE enthaltenen Ethanol wurde die Säule erneut bei maximaler Drehzahl für 1 Minute zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurden 30 μl Puffer EB in einer 1:10 Verdünnung auf die Mitte der Säule pipettiert, für 1-2 Minuten stehen gelassen und abschließend für 1 Minute in ein neues Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Es war wichtig, den Elutionspuffer direkt auf die Membran aufzutragen, damit die gesamte gebundene DNA eluiert wird. Die Effizienz der Eluation ist abhängig vom pH-Wert. Für eine optimale Ausbeute wurde dieser zwischen 7,0 und 8,5 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.2.5 Nachweis des Amplikons mittels Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese ist der Nachweis möglich, dass die gesuchte DNA-Sequenz in dem Pilzstamm vorhanden und die Amplifizierung mit Hilfe der PCR erfolgreich war. Dazu wurde eine kleine Menge PCR-Produkt in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und durch eine UV-Bestrahlung im Eagle Eye II Still Video System die Banden sichtbar gemacht. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff mit Fluoreszenzeigenschaften, der in die DNA interkaliert und dadurch die DNA-Fragmente anfärbt. Das Ergebnis konnte als Fotografie des Gels dokumentiert werden.

2.2.5.1 Herstellung von Agarosegelen

Für die Elektrophorese wurden 1,5 bzw. 2,5%ige Agarosegele in einer Pufferkonzentration von 0,5 x TAE verwendet. Dazu wurden 3 g bzw. für 2,5%ige Gele 5 g Agarose abgewogen, 2 ml TAE 50x dazupipettiert und mit Aqua bidest auf 200 ml aufgefüllt, um eine Pufferkonzentration von 0,5x TAE zu erhalten. Das Gemisch wurde für ca. 3 bis 5 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, bis sich das Agarosepulver vollständig gelöst hat. Nachdem die Gellösung etwas abgekühlt war, wurde sie in die Gelkammer gegossen. Danach wurden die Kämme eingesetzt, wodurch sich Taschen mit einem Volumen von 20 µl bildeten.

2.2.5.2 Gelelektrophorese

Das Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer Mupid®-2 gegeben und die Kammer mit dem Laufpuffer 0,5x TAE gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Die DNA-Farblösung (s. Tab. 2-12, S.38) wurde in die Taschen pipettiert, die Elektrophoresekammer geschlossen und die Elektrophorese mit einer Gleichspannung von 100 V gestartet. Die DNA-Moleküle und die Farbstoffe des Loading buffer (s. Tab. 2-6, S.27) wanderten dann entsprechend ihrer Fragmentlänge und Ladung zur Anode. Zur Bestimmung der Laufzeit diente der Farbstoff Bromphenolblau als Anhaltspunkt, dessen Wandergeschwindigkeit einem DNA-Fragment von ca. 200-300 bp entsprach. Die Bande des Farbstoffs Xylencyanol entsprach einer DNA-Fragmentlänge von ca. 5000 bp. Als Größenstandard für die DNA-Fragmentlänge dienten eine 100 bp-DNA-Leiter, eine 1 kb-DNA-Leiter und ein DNA-Leiter-Mix. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für ca. 15-30 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gegeben. Das Gel wurde dann am Eagle Eye II Still Video System unter UV-Licht angesehen und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Tab. 2-12: DNA-Farblösung für Gelelektrophorese

	Endkonzentration
DNA	variabel
6 x Loading Buffer	1x
TAE 50x	0,5x

2.2.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die zum Schneiden der amplifizierten, gereinigten DNA ausgewählten Restriktionsenzyme sind in Tab. 2-4 (S.26) aufgeführt. Es wurde jeweils der Enzym-spezifische und von der Herstellerfirma empfohlene Puffer eingesetzt. Die Puffer liegen immer 10fach konzentriert vor und müssen im Gesamtansatz 1:10 verdünnt werden. Das Enzym wurde im Gesamtansatz immer mindestens 1:20 verdünnt, da sonst das Glycerol, in dem die Enzyme aufgenommen sind, die Enzymwirkung stört. Um die DNA vollständig zu schneiden, musste das Enzym in einem 5-10fachen Überschuss vorliegen. Als Standard kann davon ausgegangen werden, dass eine Unit Enzym 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde schneidet, wenn die DNA für dieses Enzym eine entsprechende Schnittstelle besitzt. Als eine Unit ist die Menge an Enzym definiert, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde bei 37°C bzw. 65°C (je nach Enzym) in 50 µl Ansatzpuffer zu verdauen.

Der Reaktionsansatz von DNA-Lösung, Restriktionsenzym und Puffer wurde mit Aqua bidest auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur im Wärmeblock und einer Reaktionszeit von mindestens 2, in der Regel 3 Stunden. Danach wurde die gespaltene DNA für ca. 2-3 Minuten zentrifugiert und das Ergebnis der Restriktion mittels Gelelektrophorese (s.2.2.5, S.37) ermittelt oder die DNA bei -20°C gelagert.

Bei der Gelelektrophorese wurde Loading Buffer mit Xylencyanol oder ohne Farbstoff eingesetzt, da die Farbstoffe, besonders Bromphenolblau die DNA-Banden überlagern können. Die Fragmentlänge der geschnittenen DNA wurde mit Hilfe einer 100bp-DNA-Leiter oder einem DNA-Leiter-Mix nach Ethidiumbromidfärbung ermittelt. Das Ergebnis der Restriktion wurde als Fotografie dokumentiert.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung des gereinigten PCR-Produkts erfolgte durch die Firma: AGOWA, Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH, Berlin.

Dafür wurde die DNA auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt und mit den zur Amplifizierung eingesetzten Oligonukleotiden canrho1-3r und canrho1-5f (10 pmol/ml) (s.Tab. 2-5, S.27) in einem ausreichenden Volumen an die Firma geschickt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Chromatogramme zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte dann durch Vergleiche der forward- und reverse-Sequenzen, Bildung von Konsensussequenzen und mit Hilfe des Computerprogramms HUSAR [2].

Die mit Hilfe eines Computers durchgeführte Auswertung der Chromatogramme wurde manuell kontrolliert und Fehler korrigiert, sowie Bereiche, die für das Computerprogramm nicht eindeutig lesbar waren, manuell ausgewertet. Die infolge dieser Auswertung für die jeweilige Spezies erhaltene Nukleotidsequenz wurde für weitere Bearbeitungen und Vergleiche mit Hilfe des HUSAR abgespeichert. Nach Vergleich der reversen Sequenz mit der jeweiligen forward Sequenz einer Spezies erfolgte als Ergebnis die Bildung einer Konsensussequenz für jede Spezies. In den Bereichen, in denen Nukleotidabweichungen zwischen forward und reverser Sequenz vorhanden waren, erfolgte ein manueller Vergleich dieses Bereiches innerhalb der Chromatogramme und es wurde das Nukleotid mit dem aussagekräftigeren Peak an dieser Position ausgewählt. Wenn keine eindeutige Zuordnung zu einem Nukleotid möglich war, wurde an dieser Stelle in der Konsensussequenz ein „N“ eingesetzt. Unter Einsatz des HUSAR konnten die Konsensussequenzen der jeweiligen Spezies mit der publizierten Sequenz des RHO1-Gens von *C. albicans* [109] verglichen werden. Die Positionen, an denen Abweichungen zwischen den Konsensussequenzen und der RHO1-Sequenz von *C. albicans* auftraten, wurden erneut manuell innerhalb der Chromatogramme verglichen. In der Regel war es daraufhin möglich, das Nukleotid für diese Position eindeutig festzulegen. Für die Positionen, bei denen zwei Nukleotide einen identischen Peak im Chromatogramm hatten und eine eindeutige Zuordnung zu einem Nukleotid daher nicht möglich war, wurde mit Hilfe des „Single letter Codes“ der entsprechende Buchstabe für diese Nukleotide in der Konsensussequenz eingefügt (z.B. R für G{uanin} oder A{denin}). Abschließend wurden mit Hilfe des HUSAR die bekannten Primersequenzen am Anfang und Ende der Konsensussequenzen manuell eingefügt, da die Primer so konstruiert waren, dass sie am Anfang und überlappend auch am Ende der bekannten RHO1-Sequenz von *C. albicans* liegen.

3 Ergebnisse

3.1 Geeignete Polymerasen, Primer und Restriktionsenzyme

Vor Beginn der experimentellen Untersuchungen zum Nachweis des RHO1-Gens bei *Candida albicans* und anderen *Candida* Arten und dem Versuch Mikroheterogenitäten innerhalb des Gens zu finden, waren bezüglich der Auswahl der einzusetzenden Materialien einige Vorüberlegungen notwendig. Für die Amplifizierung des RHO1-Gens aus der Pilz-DNA mit Hilfe der PCR wurden geeignete Oligonukleotid-Primer benötigt, die den Genabschnitt einrahmen können und eine Polymerase, die dann unter geeigneten Reaktionsbedingungen die Primer entlang der DNA-Matrize verlängern kann.

Als Polymerasen wurden die Taq-DNA-Polymerase, ein hitzestabiles aus *Thermus aquaticus* gewonnenes Enzym, und die gentechnisch hergestellte Amplitaq®-Polymerase eingesetzt. Amplitaq® hat die gleichen Eigenschaften wie die Taq-DNA-Polymerase. Für die Spezifität der PCR-Reaktion ist neben der Auswahl der geeignetsten DNA-Polymerase u.a. von Bedeutung, wie gut die Primer an die Ziel-DNA hybridisieren. Nichtspezifische Primer, die auch an unspezifische Abschnitte der Matrize binden, verringern die Ausbeute des Amplikons und begünstigen die Bildung von Artefakten [162].

Zur Konstruktion der geeigneten Oligonukleotid-Primer canrho1-3r und canrho1-5f für die Amplifizierung des RHO1-Gens wurde die publizierte RHO1-Gensequenz von *Candida albicans* [109] als Vorlage genutzt. Die Nukleotidsequenz des 5'Primers ist identisch mit der Sequenz des 5'Endes des RHO1-Gens. Der 3'Primer ist komplementär zu den letzten Nukleotiden des 3'Endes der Gensequenz und enthält noch darüber hinausgehende Nukleotide. Am 3'Ende enthielten die Primer jeweils eine freie 3'Hydroxylgruppe an einem Desoxyadenosinnukleotid an die die dNTP's binden konnten und so der zum Matrizenstrang komplementäre Strang entstand. Für die Konstruktion der Primer wurden folgende Vorgaben definiert und berücksichtigt:

Die Primer sollten zwischen 20 und 30 Nukleotiden lang sein und die vier Basen möglichst gleich häufig vertreten sein. Um die Bildung von Primerdimeren zu verhindern, sollten die Primerpaare an ihren 3'Enden nicht komplementär sein. Außerdem waren die Primer so zu konstruieren, dass sie eine ähnliche Schmelztemperatur T_m (Berechnung s.Tab. 2-5, S.27) haben. Diese diente aber nur als Anhaltspunkt für die Bindungstemperatur der Primer, welche dann in Vorversuchen optimiert wurde [162; 89].

Für den Nachweis von Mikroheterogenitäten innerhalb des RHO1-Gens wurde das PCR-Produkt mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Bei der Auswahl der Enzyme wurden folgende Gesichtspunkte berücksichtigt:

- sie sollten nur einmal innerhalb der Sequenz schneiden,
- bei der Spaltung sollte möglichst ein kleines und ein großes DNA-Fragment entstehen, damit diese in der Gelelektrophorese differenzierbar sind und
- es sollte keine Isoschizomere, d.h. Enzyme mit der gleichen Erkennungssequenz, die aus anderen Organismen isoliert werden, als den Prototyp des ausgewählten Restriktionsenzym geben.

Die Auswahl der geeigneten Restriktionsendonukleasen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms HUSAR des HUSAR Bioinformatics Lab am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg. Das HUSAR Bioinformatics Lab stellt mehr als 200 ständig aktualisierte Datenbanken (z. B. EMBL, GenBank) und Softwarepakete mit verschiedenen „Werkzeugen“ (Möglichkeiten) zur DNA- und Proteinanalyse zur Verfügung [2].

3.2 Beschreibung einer optimierten Methode zur PCR von *Candida albicans*

Zur Auswahl der für die Bearbeitung der Problemstellung geeignetesten methodischen Schritte wurden zuerst die optimalen Primer ermittelt.

3.2.1 Vergleich der ausgewählten Primer mit bekannten Primern

Um festzustellen, welche der verfügbaren Primer für die Amplifizierung des RHO1-Gens am besten geeignet sind, wurden die Primerpaare canrho1-5f/canrho1-3r und grl5/grl3.rev im direkten Vergleich getestet. Das bei *C. albicans* gefundene RHO1-Gen hat eine Sequenzlänge von 597 Nukleotiden [109]. Unter den bereits erwähnten Gesichtspunkten (siehe 3.1) wurden die Primer canrho1-5f und canrho1-3r kreiert, um mit der PCR das RHO1-Gen bei verschiedenen *Candida* Spezies nachzuweisen. Die Nucleotidsequenz der Primer ist in Tab. 2-5, S.27 dargestellt. Um kontrollieren zu können, dass das Primerpaar canrho1-5f/canrho1-3r spezifisch zur Amplifizierung des RHO1-Gens geeignet ist, erfolgte ein direkter Vergleich mit dem Primerpaar grl5/grl3.rev, von dem bekannt war, dass es zur Amplifizierung von Pilz-DNA geeignet ist.

Es wurde von zwei verschiedenen *Candida albicans*-Stämmen dieselbe Menge an Pilzzellen zur DNA-Präparation eingesetzt und die gleiche Konzentration gereinigter DNA für die PCR

verwendet. Die Amplifizierung der DNA mit Hilfe des jeweiligen Primerpaares erfolgte unter identischen PCR-Bedingungen. In der darauf folgenden Gelelektrophorese wurden die DNA zum direkten Vergleich parallel auf ein Gel aufgetragen. Damit wurde sichergestellt, dass eventuelle Abweichungen des Ergebnisses nur auf die unterschiedlichen Primer zurückzuführen waren. Das Ergebnis ist in der Abb. 3-1 (S.42) dargestellt.

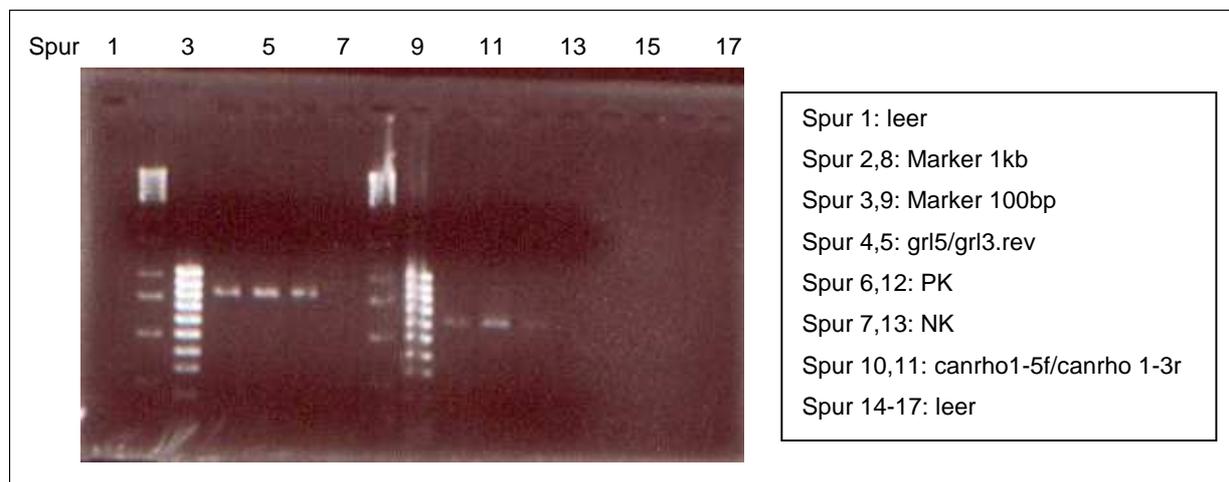


Abb. 3-1: Elektropherogramm amplifizierter *C. albicans*-DNA mit den Primerpaaren canrho1-5f/canrho1-3r und grl5/grl3.rev

Mit dem Primerpaar grl5/grl3.rev wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von etwa 850 bp amplifiziert (Spur 4 und 5), mit dem Primerpaar canrho1-5f/canrho 1-3r ein DNA-Fragment von etwa 600 bp (Spur 10 und 11), dem erwarteten PCR-Produkt des RHO1-Gens (597 bp). Diese Oligonukleotid-Primer wurden deshalb in den folgenden Experimenten zur Amplifizierung des RHO1-Gens verwendet.

3.2.2 Einfluß von Denaturationszeit, Annealingtemperatur und Extensionszeit auf die Amplifizierung

Die PCR-Bedingungen sind neben den optimalen Primern von entscheidender Bedeutung für die Effektivität und Spezifität der PCR-Reaktion. Aus diesem Grund wurden in Vorversuchen verschiedene Zeiten bzw. Temperaturen für die Denaturierung, die Primeranlagerung und Verlängerung getestet, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Bezüglich der verwendeten PCR-Reagenzien (s.Tab. 2-10, S.34) bestanden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen. Zunächst wurden die Annealingtemperaturen variiert: 45° C, 50° C, 55°

C, 60° C und 65° C. Im nächsten Schritt wurden Extensionszeiten von 1 und 2 Minuten getestet.

In sechs verschiedenen Versuchen wurde von zwei verschiedenen *C. albicans* Stämmen (Stamm 1: *C. albicans* Pat. x; Stamm 2: *C. albicans* 10269) jeweils die gleiche DNA-Konzentration zur PCR eingesetzt und das RHO1-Gen amplifiziert, was in nachfolgender Gelelektrophorese kontrolliert wurde. Auf zwei Agarosegele wurde zum direkten Vergleich jeweils die DNA beider Stämme mit identischer für die PCR gewählter Annealingtemperatur nebeneinander aufgetragen. Es wurde ein DNA-Fragment von 600bp, das RHO1-Gen, amplifiziert. Das Ergebnis veranschaulicht die Abb. 3-2 (S.43).

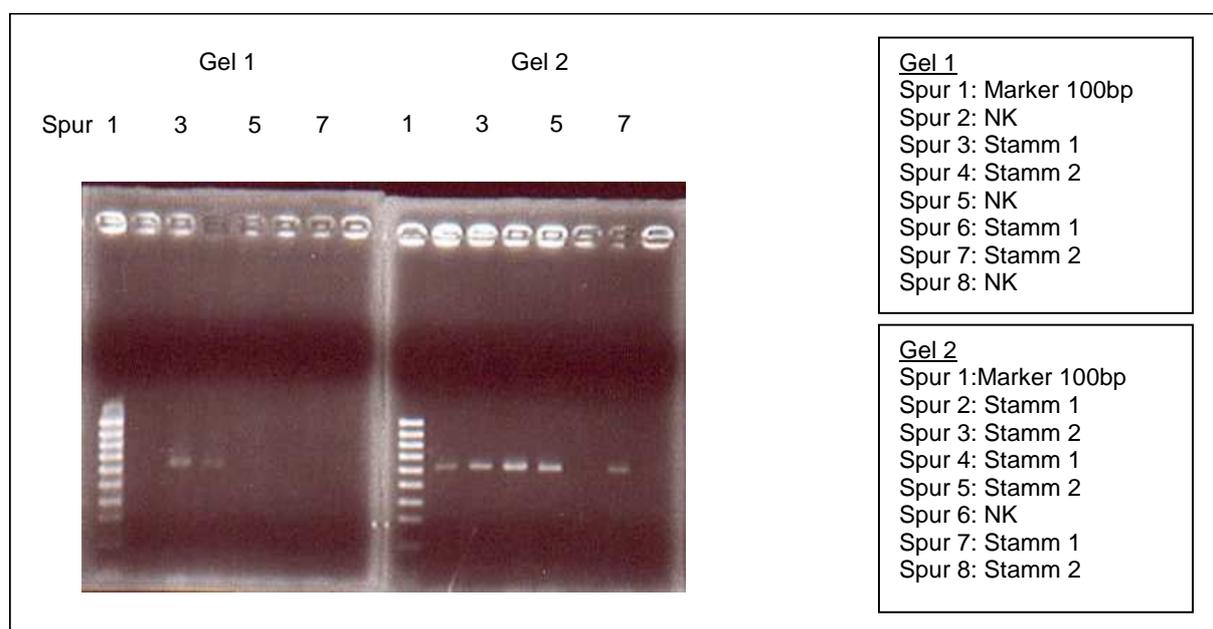


Abb. 3-2: Elektropherogramm des unter verschiedenen PCR-Bedingungen amplifizierten RHO1-Gens zweier *C. albicans*-Stämme

Die deutlichsten Banden sind in den Spuren 4 und 5 (Gel 2) mit einer Annealingtemperatur von 45° C und in den Spuren 2 und 3 (Gel 2) mit einer Annealingtemperatur von 50° C zu erkennen. Erfolgte die Anlagerung der Primer bei 55° C ist nur bei Stamm 1 die DNA amplifiziert worden, wie in Spur 7 zu erkennen ist. Eine schwache Bande von Stamm 1 und eine im Vergleich dazu schwächere Bande von Stamm 2 ist bei einer Annealingtemperatur von 60° C in der dritten bzw. vierten Spur des ersten Gels zu sehen. Bei Annealingtemperaturen von 65° C erfolgte keine Amplifizierung der DNA (Spur 6,7 1.Gel). Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte in den nachfolgenden Experimenten die Denaturierung

der DNA bei 93° C und die Verlängerung der Primer bei 72° C. Die Anlagerung der Primer (Annealing) wurde anfänglich bei 50° C durchgeführt und dann aufgrund der nicht immer zufriedenstellenden Ergebnisse auf 45° C herabgesetzt. Zusammengefasst sind die optimalen PCR-Bedingungen in Tab. 2-11 (S.35) dargestellt.

3.2.3 Überprüfung des OD-Wertes als Meßgröße für die DNA-Konzentration mit verschiedenen Verfahren

In weiteren Experimenten wurde geprüft, ob die Annahme, dass bei *Candida*-Pilzen eine optische Dichte (OD) von 1,0 üblicherweise 5×10^7 Pilzzellen/ml entspricht, richtig ist. Dazu wurden zwei verschiedene Verfahren getestet: Auszählen der Pilzzellen in der Neubauer-Zählkammer und CFU-Bestimmung.

Von der Suspension einer Übernachtsschüttelkultur (*C. albicans* Stamm B 10433) wurde am Photometer die optische Dichte gemessen (s.2.2.3.2, S.31) und daraus die Zellzahl pro ml berechnet. Von dieser optischen Dichte bzw. dieser Keimzahl ausgehend wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1×10^7 /ml hergestellt. Diese bildete dann die Grundlage für die Herstellung von Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen: 1×10^6 /ml, 1×10^5 /ml und 1×10^4 /ml.

Von jeder dieser Suspensionen erfolgte die Quantifizierung der Pilzzellen unter dem Mikroskop unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer (s.2.2.3.3, S.31), sowie nach Ausplattieren auf Sabouraud-Agar und Bebrütung bei 37° C für mind. 24 h die CFU-Bestimmung. Der Vergleich der Werte mit diesen verschiedenen Methoden erbrachte das in der Tab. 3-1 (S.44) dargestellte Ergebnis.

Tab. 3-1: Konzentrationsbestimmung (Keimzahl/ml) mit verschiedenen Methoden

Verdünnungsreihe nach Messung der OD der ü/n-Kultur	Gemessene OD	Aus OD berechnete Konzentration	Aus mikroskopischer Zählung (Neubauer-Kammer) berechnete Konzentration	Aus CFU berechnete Konzentration
1×10^7 /ml	0,27	$3,7 \times 10^7$ /ml	$1,83 \times 10^7$ /ml	$0,88 \times 10^7$ /ml
1×10^6 /ml	0,02	5×10^7 /ml	$0,8 \times 10^6$ /ml	$0,49 \times 10^6$ /ml
1×10^5 /ml	Nicht messbar		$1,5 \times 10^5$ /ml	$0,58 \times 10^5$ /ml
1×10^4 /ml	Nicht messbar		5×10^4 /ml bis $1,5 \times 10^5$ /ml	$0,48 \times 10^4$ /ml

Der Vergleich zwischen der optischen Dichte, auf deren Basis die Verdünnungsreihe aufgebaut wurde, und den mit den zwei verschiedenen Verfahren berechneten Zellzahlen pro ml erbrachte nur geringe Abweichungen mit einem Faktor von 0,5-2.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für weitere Berechnungen angenommen, dass eine optische Dichte von $1,0 \cdot 5 \times 10^7$ Pilzzellen/ml entspricht.

3.2.4 Vergleich der verschiedenen DNA-Präparationsmethoden und experimenteller Nachweis der Nachweisgrenze der PCR zur Ermittlung der optimalen DNA-Ausgangsmenge für die PCR

Nachdem die Optimierung der PCR-Bedingungen erfolgt war, musste die optimale Methode für die Extraktion der Pilz-DNA herausgefunden und der Nachweis erbracht werden, bei welcher in der PCR eingesetzten DNA-Konzentration die Amplifizierung des RHO1-Gens noch möglich ist bzw. bei welcher DNA-Konzentration man eine aussagekräftige Bande in der Gelelektrophorese erhält.

Von den verschiedenen Konzentrationen ausgehend wurde einerseits die DNA-Freisetzung ohne Reinigung der DNA (s.2.2.3.1, S.31) und eine „klassische“ DNA-Extraktion (s.2.2.3.4, S.32) durchgeführt.

Ausgehend von der Übernachtskultur des *C. albicans* Stammes P 10269 bzw. B 10433 wurde mittels der OD-Methode eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1×10^7 /ml hergestellt, welche als Grundlage für die Verdünnungsreihe diente. Im Verlauf wurde die Stammlösung zusätzlich aufkonzentriert, um eine Konzentration von 1×10^8 /ml zu erhalten. Jeweils 1 μ l der DNA-Lösung wurde in einem PCR-Reaktionsvolumen von 100 μ l zur Amplifizierung des RHO1-Gens eingesetzt. Da anfänglich nur Banden der Positivkontrolle sichtbar waren, wurde einerseits die Annealingtemperatur von 50° C auf 45° C gesenkt (s.Tab. 2-11, S.35). Da dies zu keiner Ergebnisverbesserung führte, wurde andererseits die Übernachtschüttelkultur 3-5h vor der DNA-Extraktion 1:10 bis 1:20 in Flüssigmedium (Sabouraud-Bouillon) verdünnt und erneut bei 36° C auf dem Schüttler inkubiert. Darüber hinaus wurde zum modifizierten TE-Puffer das nichtionische Detergens Tween 20 dazugegeben, um eine Verbesserung der Zellyse der Pilze zu erreichen, da möglicherweise die Zellwand der Pilze während des Erhitzens im Wärmeblock (s.2.2.3.1, S.31) nicht ausreichend zerstört worden war.

Unter Berücksichtigung dieser Veränderungen zeigte sich bei einer Konzentration von 10^5 Pilzzellen/ μ l, d.h. einer Menge von 1000 Pilzen pro PCR-Ansatz, mit der „schnellen“ DNA-

Präparationsmethode eine schwache Bande bei 600 bp in der Gelelektrophorese, wie der Abb. 3-4 (S.47) (Spur 3) zu entnehmen ist.

Dagegen erhält man mit der klassischen DNA-Präparationsmethode auch bei einer Konzentration von $10^4/\mu\text{l}$ und damit einer zehnfach geringeren Menge an Pilzzellen, d.h. bei 100 Pilzen pro PCR-Ansatz, noch eine stärkere Bande in der Elektrophorese. Das Ergebnis veranschaulicht die Abb. 3-3 (S.46).

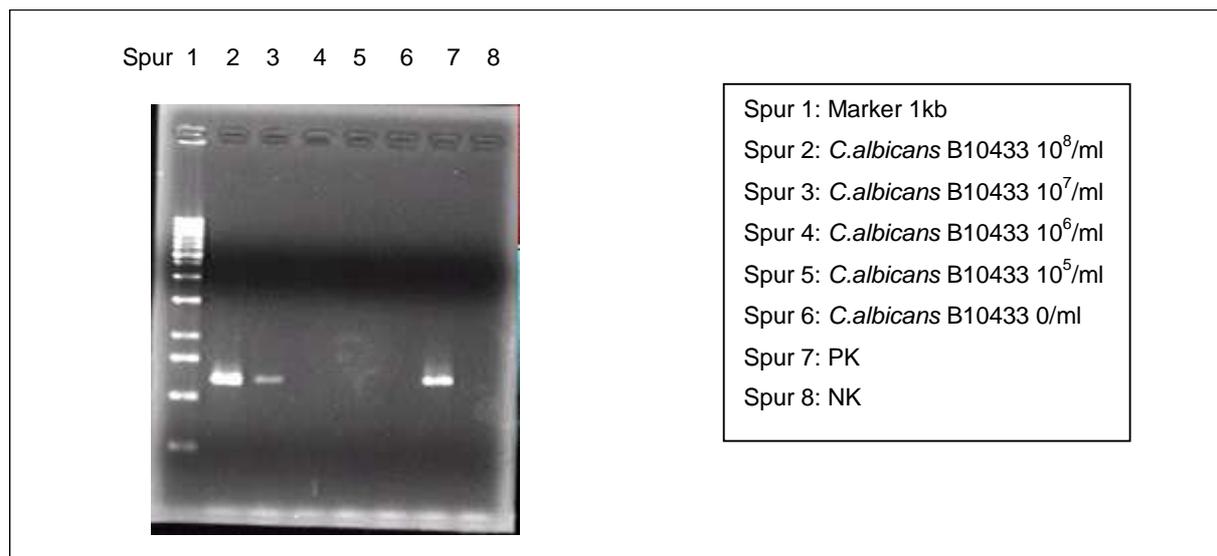


Abb. 3-3: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des *C. albicans* Stammes B10433 nach „klassischer“ DNA-Präparationsmethode in verschiedenen Konzentrationen

Betrachtet man die bei identischer pro PCR-Reaktionsansatz eingesetzte Zellzahl von 1000 Pilzzellen ist der Vorteil der „klassischen“ Präparationsmethode gegenüber der DNA-Freisetzung ohne nachfolgende Reinigung, wie in Abb. 3-4 (S.47) gezeigt wird, deutlich sichtbar. Die Bande in Spur 10 ist eindeutig kräftiger als die Bande in Spur 3.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die Ausbeute und Qualität der DNA nach Extraktion mit der „klassischen“ DNA-Präparationsmethode (s.2.2.3.4, S.32) deutlich höher ist, als mit der DNA-Freisetzungsmethode ohne Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation (s.2.2.3.1, S.31).

Aus diesen Gründen wurde in den weiteren Versuchen generell die „klassische“ DNA-Präparationsmethode mit Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation eingesetzt.

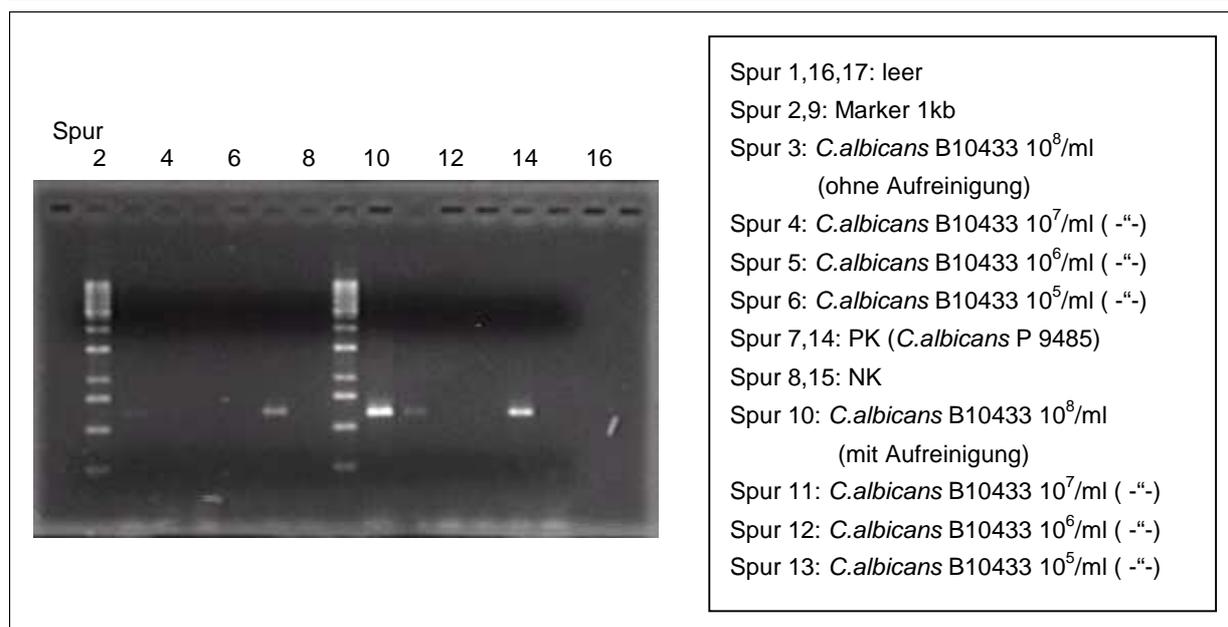


Abb. 3-4: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des *C. albicans* Stammes B10433 zum Vergleich der „schnellen“ und „klassischen“ DNA-Präparationsmethode in verschiedenen Konzentrationen

Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, bei welcher DNA-Konzentration pro 100 μ l PCR-Reaktionsvolumen in der Gelelektrophorese noch eine Bande zu erkennen ist.

Nach erneuter „klassischer“ DNA-Präparation (*C. albicans* Stamm B 10433) wurde die DNA-Konzentration am UV-Photometer (Ultraspex III) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen (s.2.2.3.7, S.33) und erbrachte folgende Werte:

OD 260 nm (für DNA): 0,061 und OD 280 nm (für Proteine): 0,028.

Der Quotient aus OD 260/OD 280 der Probe lag bei 2,18, so dass die DNA sauber präpariert worden war. Die Berechnung der Gesamtmenge der DNA dieser Präparation (s. 2.2.3.7; S.33) ergab 16,17 μ g.

Ausgehend von einer Stammlösung mit der Konzentration von 0,61 μ g/ μ l wurde eine Verdünnungsreihe mit den in der folgenden Tab. 3-2 (S.48) dargestellten Verdünnungsstufen hergestellt und die PCR mit unveränderten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 3-2: Verdünnungsreihe I *C. albicans* B 10433

Verdünnungsreihe	DNA-Konzentration in µg/µl
Stammlösung	0,61
1:10	0,061
1:15	0,041
1:30	0,02
1:50	0,0122
1:100	0,0061

In der Gelelektrophorese war bei jeder Konzentration eine Bande bei 600 bp zu sehen. Daraufhin wurde die Verdünnungsreihe erweitert. In der Tab. 3-3 (S.48) sind die weiteren Verdünnungsstufen, mit denen eine PCR durchgeführt wurde, als Übersicht dargestellt.

Tab. 3-3: Verdünnungsreihe II *C. albicans* B 10433

Verdünnungsreihe	DNA-Konzentration in µg/µl
1:1000	0,00061
1:5000	0,00012
1:10.000	$0,61 \times 10^{-4}$
1:25.000	$0,24 \times 10^{-4}$
1:50.000	$0,12 \times 10^{-4}$
1:75.000	$8,1 \times 10^{-6}$
1:100.000	$6,1 \times 10^{-6}$

Die Darstellung des Gesamtergebnisses mit ausgewählten Verdünnungsstufen veranschaulicht die Abb. 3-5 (S.49).

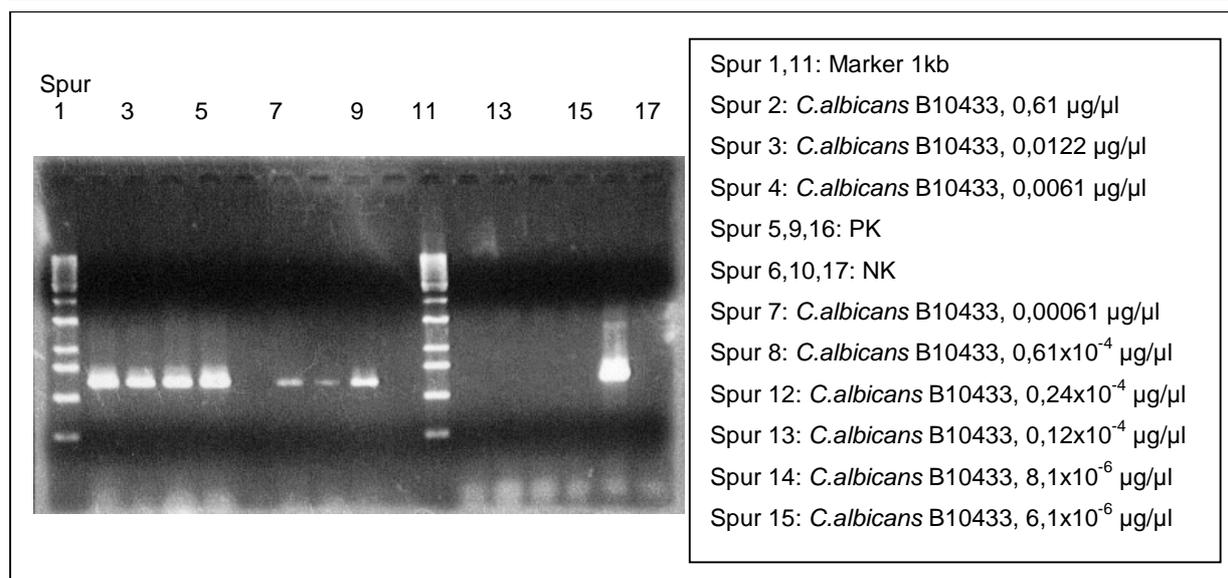


Abb. 3-5: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des *C. albicans* Stammes B10433 in ausgewählten Verdünnungsstufen zur Ermittlung der PCR-Nachweisgrenze

Die erkennbaren Banden entsprechen mit einer Größe von 600bp dem PCR-Produkt des RHO1-Gens. Eine kräftige Bande zeigt sich für die folgenden Konzentrationen: 0,61µg/µl, 0,0122 µg/µl und 0,0061 µg/µl. Bei einer Konzentration von 0,61x10⁻⁴ µg/µl pro 100µl PCR-Ansatz ist die schwächste Bande zu sehen. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen:

Eine DNA-Konzentration von 0,61x10⁻⁴ µg/µl entspricht in einem PCR-Reaktionsvolumen von 100 µl einer absoluten DNA-Menge von 0,61x10⁻⁶ µg, d.h. die Nachweisgrenze der PCR, bei der in der Gelelektrophorese noch eine Bande erkennbar ist, liegt bei 0,61x10⁻⁶ µg Pilz-DNA. Unter Berücksichtigung des vorangegangenen Ergebnisses, dass die DNA aus 100 Pilzen pro PCR-Ansatz in der Elektrophorese noch als Bande erkennbar ist sind lässt sich schlussfolgern, das 100 Pilze mindestens 0,61x10⁻⁶ µg DNA enthalten.

Die Nachweisgrenze der PCR, bei der in der Gelelektrophorese noch eine Bande zu sehen ist, liegt somit bei etwa 35 Genomen (Berechnung s. 2.2.4, S.34). Auf diesen experimentellen Ergebnissen aufbauend, wurde in den folgenden Untersuchungen jeweils eine definierte DNA-Konzentration pro 100 µl PCR-Reaktionsvolumen eingesetzt.

3.3 Prüfung des Vorhandenseins des RHO1 - Gens in *Candida albicans* Stämmen

3.3.1 Nachweis des RHO1-Gens in *Candida albicans* Stämmen

Eine Zielstellung der Dissertation war der Nachweis des RHO1-Gens bei *C. albicans* mittels PCR und Gelelektrophorese. Zunächst erfolgte eine kulturelle Auswahl der Stämme (s. 2.2.1; S.28). Wie aus der Tab. 2-8 (s.S.28) ersichtlich ist, waren die DNA-Konzentrationen der *C. albicans*-Stämme sehr unterschiedlich. Um im Experiment zum Nachweis des RHO1-Gens vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war es wichtig, dass pro PCR-Ansatz (s. Tab. 2-10; S.34) jeweils eine definierte, für jeden Stamm gleiche DNA-Konzentration eingesetzt wurde. Andererseits sollten Verdünnungsexperimente zeigen, ob die DNA-Präparationen diluierbare Inhibitoren enthielten. Es wurde deshalb zunächst unter Berücksichtigung der vorangegangenen Ergebnisse (s. 3.2.4; S.45) untersucht, welche DNA-Konzentration für den Erhalt aussagekräftiger Elektrophoresebanden optimal ist.

Nachdem sich der Konzentrationsbereich von 0,0006 µg/µl bzw. 0,006 µg/µl als nicht aussagekräftig genug erwies, wurde von den Stämmen 5466 und 5554 mit den in der Tab. 3-4 (S.50) dargestellten Verdünnungsreihen eine PCR mit jeweils 1µl DNA pro 100µl PCR-Reaktionsansatz mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt.

Tab. 3-4: Verdünnungsreihe *C.albicans* 5466 und 5554

Verdünnungsreihe	DNA-Konzentration in µg/µl	
	Stamm 5466	Stamm 5554
1:10	0,037	0,11
1:50	0,0074	0,022
1:100	0,0037	0,011

Das Ergebnis veranschaulicht die Abb. 3-6 (S.51).

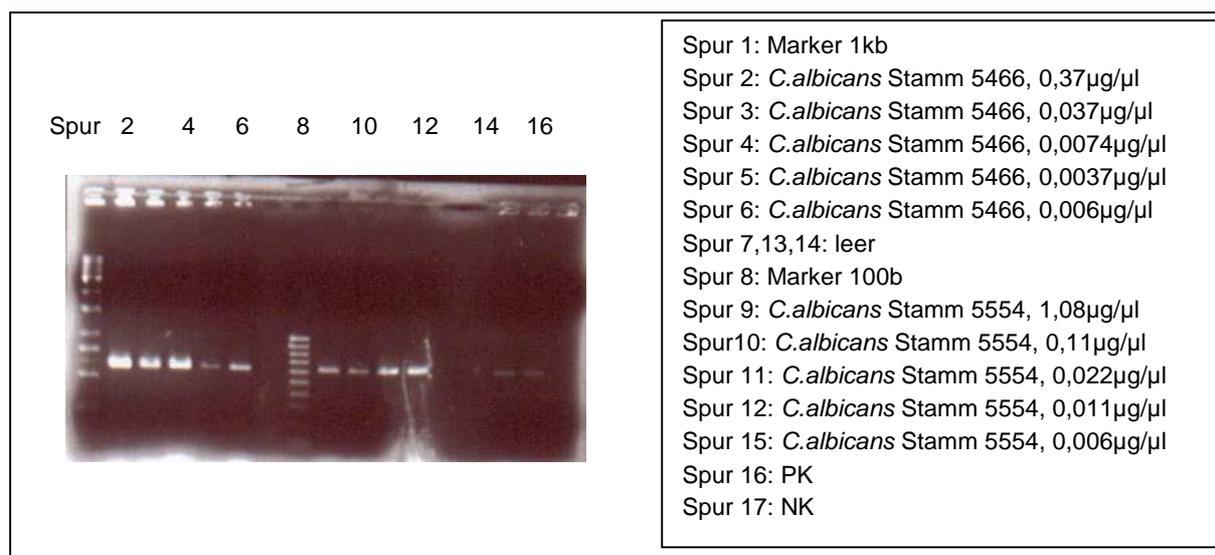


Abb. 3-6: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der *C. albicans* Stämme 5466 und 5554 in ausgewählten Konzentrationen zur Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration für die PCR

Das RHO1-Gen wurde in allen Ansätzen amplifiziert, erkennbar an der Größe der Banden von 600 bp. Die kräftigsten Banden sind bei den Proben mit den Ausgangs-DNA-Konzentrationen 0,37 µg/µl, 0,037 µg/µl und 0,0074 µg/µl zu erkennen. Etwas schwächer, aber ebenfalls aussagekräftig sind die Banden der Proben mit den Ausgangs-DNA-Konzentrationen 0,022 µg/µl und 0,011 µg/µl. Die übrigen Banden sind deutlich schwächer ausgeprägt. In den weiteren Experimenten wurde deshalb jeweils 1µl DNA mit einer Konzentration von 0,022 µg/µl pro 100 µl PCR-Reaktionsansatz eingesetzt. Vergleicht man die Bandenstärke der beiden untersuchten Stämme miteinander, ist auffällig, dass die Banden des Stammes 5466 insgesamt kräftiger sind, als die Banden des Stammes 5554.

Nach Abschluß dieser Vorversuche sollte der Nachweis des Vorhandenseins des RHO1-Gens bei *C. albicans* [109] an den 30 verschiedenen *C. albicans* Stämmen erbracht werden. Dazu wurden die Proben (s. Tab. 2-8; S.28) auf eine einheitliche DNA-Konzentration von 0,02 µg/µl im 3fach-Ansatz eingestellt. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Gelelektrophorese dokumentiert. Insgesamt konnte bei 29 der 30 verschiedenen *Candida albicans*-Stämme das RHO1-Gen amplifiziert werden, wie in Abb. 3-7: ;(S.52) beispielhaft mit den Stämmen S 137, 5535, 5442 und 5423 gezeigt wird.

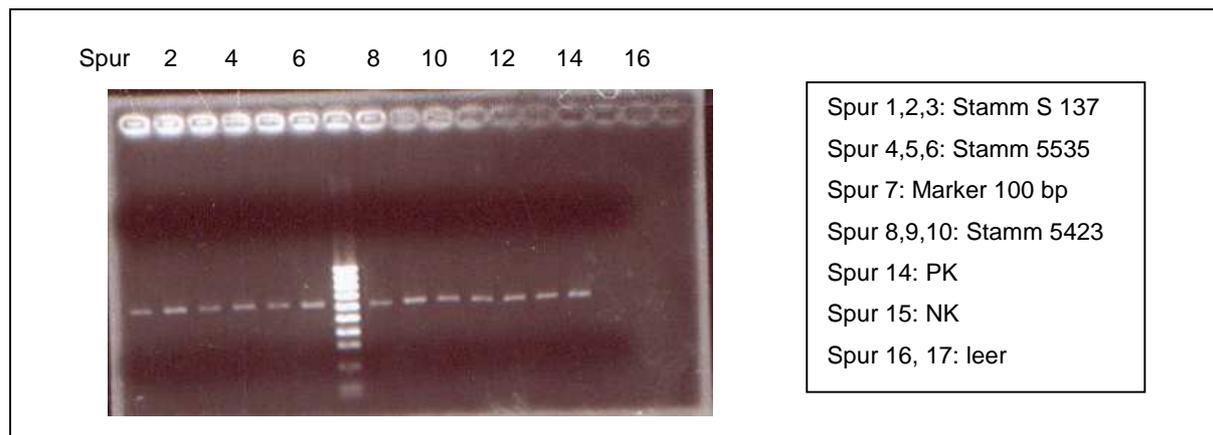


Abb. 3-7: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der *C.albicans* Stämme S 137, 5535, 5442 und 5423

Bei dem *C. albicans* Stamm S 130 konnte das RHO1-Gen auch bei wiederholter PCR nicht amplifiziert werden, wie in der Abb. 3-8 (S.52) zu erkennen ist.

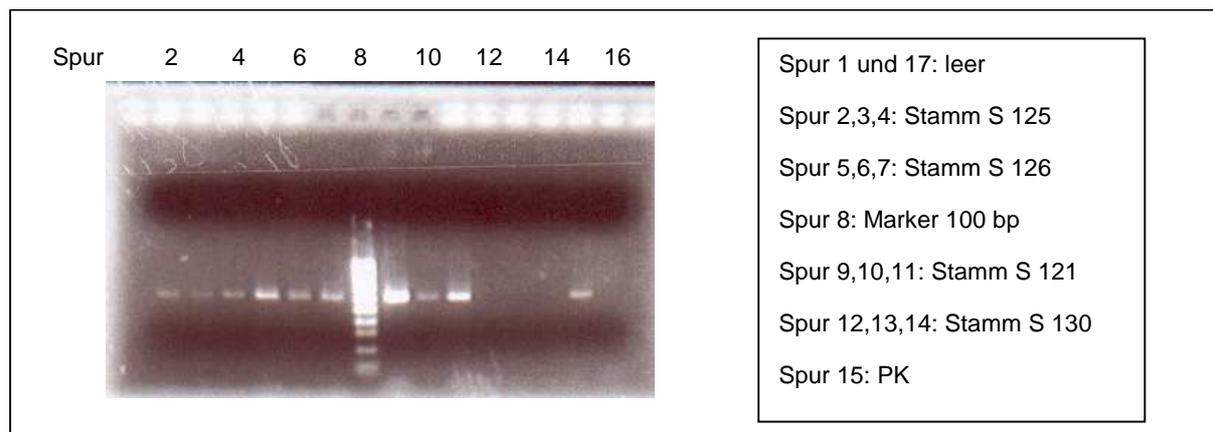


Abb. 3-8: Elektropherogramm: Kein Nachweis des RHO1-Gens bei dem *C.albicans* Stamm S 130

Von den Ansätzen des Stammes S 130 waren jedoch auch in der Wiederholung keine Banden zu sehen. Es stellte sich somit die Frage, ob das RHO1-Gen bei diesem *C. albicans* Stamm nicht vorhanden oder ob die DNA dieses Stammes nicht amplifizierbar ist ?

Um das Vorhandensein amplifizierbarer DNA in der Probe zu beweisen, wurde eine PCR mit Primern für eine andere Ziel-DNA durchgeführt. Es wurde das Primerpaar 153/154 (s.Tab. 2-5; S.27) verwendet, mit dem ein hoch konservierter Abschnitt des 18s rRNA-Gens von Pilzen amplifiziert wird [132; 50]. Die zu erwartende Größe des Amplikons variiert je nach

Pilzspezies zwischen 482 und 503 bp [50]. Parallel dazu wurde von zwei verschiedenen DNA-Präparationen dieses Stammes die PCR mit dem Primerpaar 1/2 bei identischen PCR-Bedingungen wiederholt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese veranschaulicht die Abb. 3-9 (S.53).

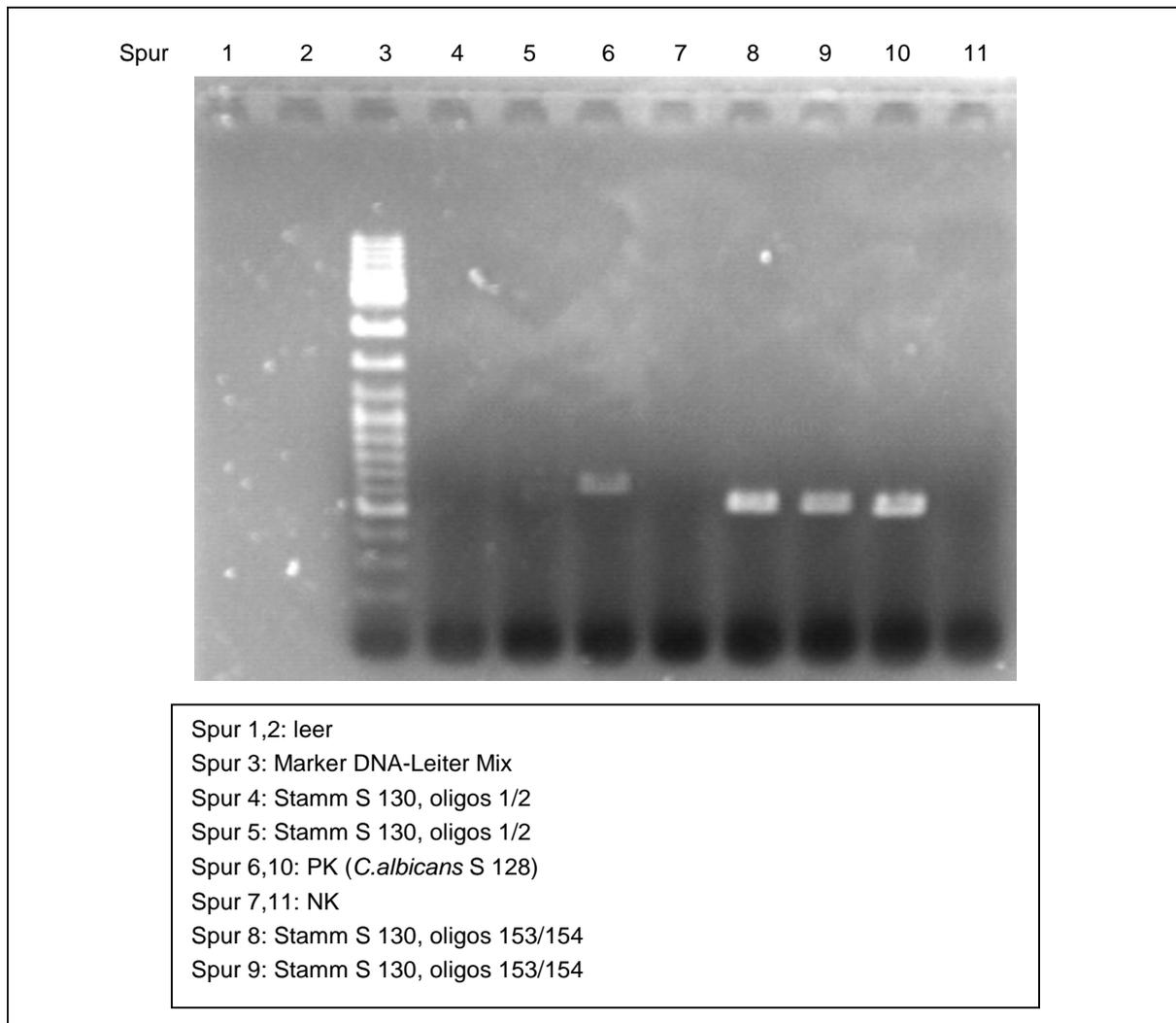


Abb. 3-9: Elektropherogramm amplifizierter DNA des *C. albicans* Stammes S 130 mit dem Primerpaar 153/154 und erneut keine Amplifizierung des RHO1-Gens dieses Stammes

Mit dem Primerpaar 1/2 erfolgte erneut keine Amplifizierung der DNA des Stammes S 130. Den Beweis, dass die DNA prinzipiell amplifizierbar ist, zeigen die homogenen Banden bei 500 bp in Spur 8 und 9.

Zusammenfassend lässt sich damit feststellen: von den 30 verschiedenen *Candida albicans* Stämmen war das RHO1-Gen bei 29 Stämmen nachweisbar. Bei dem Stamm S 130 konnte das RHO1-Gen nicht nachgewiesen werden, obwohl nachgewiesen wurde, dass die DNA prinzipiell amplifizierbar ist.

3.4 Nachweis von Mikroheterogenitäten anhand der Schnittmuster der Restriktionsenzyme

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit beinhaltete Untersuchungen, ob innerhalb des RHO1-Gens bei verschiedenen *C. albicans* Stämmen Mikroheterogenitäten nachweisbar sind.

Für den Nachweis von Mikroheterogenitäten innerhalb des RHO1-Gens wurde das PCR-Produkt mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten (s.2.2.6; S.38). Liegen innerhalb der Gensequenz Mutationen vor, so wird die Restriktion für Restriktionsenzyme, dessen Schnittstelle in diesem veränderten Bereich liegt, verhindert. Infolgedessen entstehen weniger Fragmente oder Fragmente mit anderen Längen. Andererseits ist es auch möglich, dass das Enzym schneidet, eine Insertion oder Deletion in einem anderen Bereich des Gens jedoch durch eine Längenzunahme oder – abnahme bestimmter Restriktionsfragmente visualisiert wird. Mittels nachfolgender Agarosegelelektrophorese erfolgt ein Vergleich der Länge der Restriktionsfragmente zwischen den verschiedenen *C. albicans* Stämmen. Die Kriterien, nach denen die Restriktionsenzyme ausgewählt wurden, sind im Abschnitt 3.1 (S.40) näher erläutert.

Die Tab. 3-5 (S.55) veranschaulicht die fünf verwendeten Restriktionsenzyme und zeigt, an welchen Positionen des RHO1-Gens [109] die Enzyme erwartungsgemäß schneiden. Das für das jeweilige Enzym zu erwartende Schnittmuster des RHO1-Gens veranschaulicht Abb. 3-10 (S.55).

Tab. 3-5: Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz 5' → 3'	Schnittstelle bei RHO1	Fragmentgrößen
BseNI	ACTG_Gn`	424	424 bp; 173 bp
Cfr10I	r`CCGG_Y	499	499 bp; 98 bp
HpaII	C`CG_G	500	500 bp; 97 bp
RsaI	GT`AC	96	96 bp; 501 bp
VspI	AT`TA_AT	76	76 bp; 521 bp

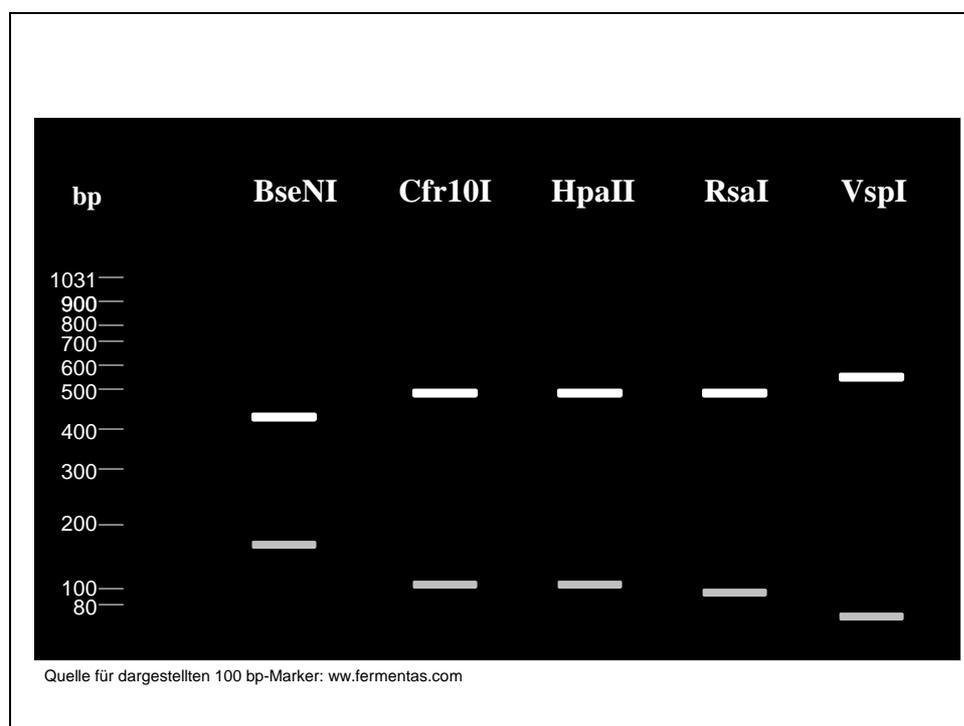


Abb. 3-10: Schematische Darstellung der zu erwartenden Schnittmuster nach Restriktion des RHO1-Gens mit den fünf ausgewählten Restriktionsendonukleasen BseNI, Cfr10I, HpaII, RsaI und VspI

In Voruntersuchungen wurde die geeignete Konzentration pro Reaktionsansatz für jedes Enzym ermittelt. Dazu wurde die DNA des *C. albicans* Stammes 5554 auf eine Konzentration von 0,02 µg/µl eingestellt und mittels PCR das RHO1-Gen amplifiziert. Nach Dokumentation des Ergebnisses mit der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte gereinigt (s.2.2.4.2; S. 35). Die Restriktionsenzyme wurden in den 3 Konzentrationen 5U/Ansatz, 1U/Ansatz und 0,1U/ Ansatz getestet. Die Inkubationstemperatur für BseNI lag bei 65°C, die anderen

Enzyme benötigten eine Inkubationstemperatur von 37°C. Es wurde nicht das gesamte PCR-Produkt geschnitten, damit ein Teil der ungeschnittenen DNA in der Gelelektrophorese parallel zur geschnittenen DNA aufgetragen werden konnte, um einen unmittelbaren Vergleich der Bandengröße zu ermöglichen.

Für die Enzyme HpaII, RsaI und VspI war bei den getesteten Konzentrationen kein Unterschied in der Qualität der Schnittbanden erkennbar, so dass sie in den nachfolgenden Experimenten in einer Konzentration von 0,1U/Ansatz eingesetzt wurden. Die Testung der Enzyme Cfr10I und BseNI ergab, dass eine höhere Enzymkonzentration pro Ansatz eingesetzt werden muss, was beispielhaft für alle Enzyme in der Abb. 3-11 (S.56) dargestellt ist.

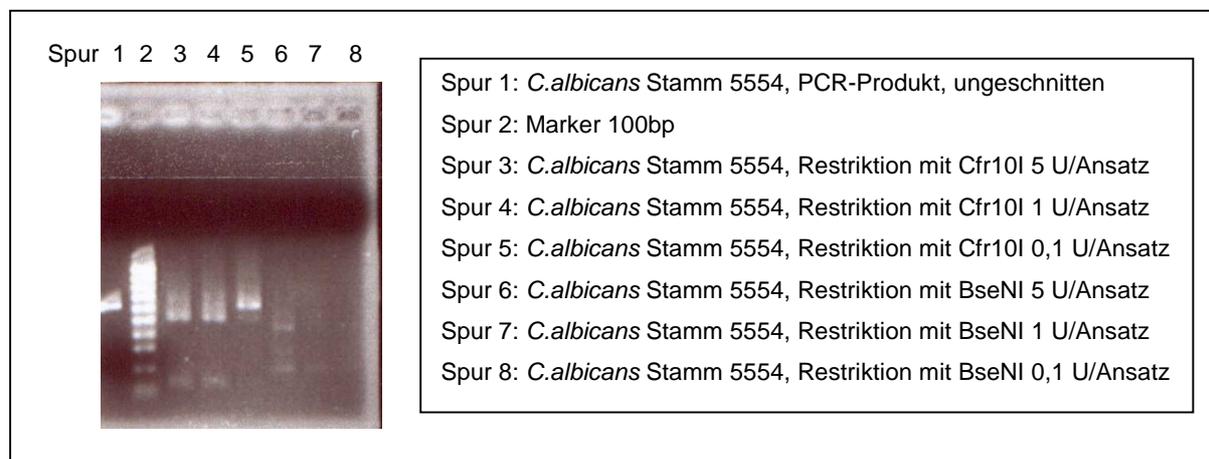


Abb. 3-11: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des *C.albicans* Stammes 5554 nach Restriktion mit Cfr10I und BseNI bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

In der Gelelektrophorese wurden von dem ungeschnittenen PCR-Produkt und dem Restriktions-Produkt vergleichbare DNA-Mengen eingesetzt. Bei den mit dem Enzym Cfr10I geschnittenen Proben erkennt man, dass nur in den höheren Enzymkonzentrationen außer der Bande des ungeschnittenen PCR-Produkts bei 600 bp die Banden der DNA-Fragmente in der erwarteten Lauflänge bei 500 bp und 100 bp zu sehen sind. Ein damit vergleichbares Ergebnis erbrachte die Restriktion mit BseNI, die erwarteten DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 420 bp und 170 bp sind am deutlichsten in einer Enzymkonzentration von 5U/Ansatz erkennbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden beide Enzyme zum Schneiden des amplifizierten RHO1-Gens der *C. albicans* Stämme in einer Konzentration von 1U/Ansatz eingesetzt, da diese Enzymmengen zur Identifizierung der Schnittbanden

ausreichend waren, auch wenn höhere Enzymkonzentrationen noch kräftigere Banden zeigen.

Danach wurde das amplifizierte RHO1-Gen der 29 *C. albicans* Stämme (s.2.2.1; S.28) zum Nachweis von Mikroheterogenitäten innerhalb der RHO1-Gensequenz, mit den ausgewählten Restriktionsenzymen BseNI, Cfr10I, HpaII, RsaI und VspI geschnitten (s.2.2.6; S.38). Abb. 3-12 (S.57) zeigt das Ergebnis für zwei *C. albicans* Stämme stellvertretend für alle anderen Stämme.

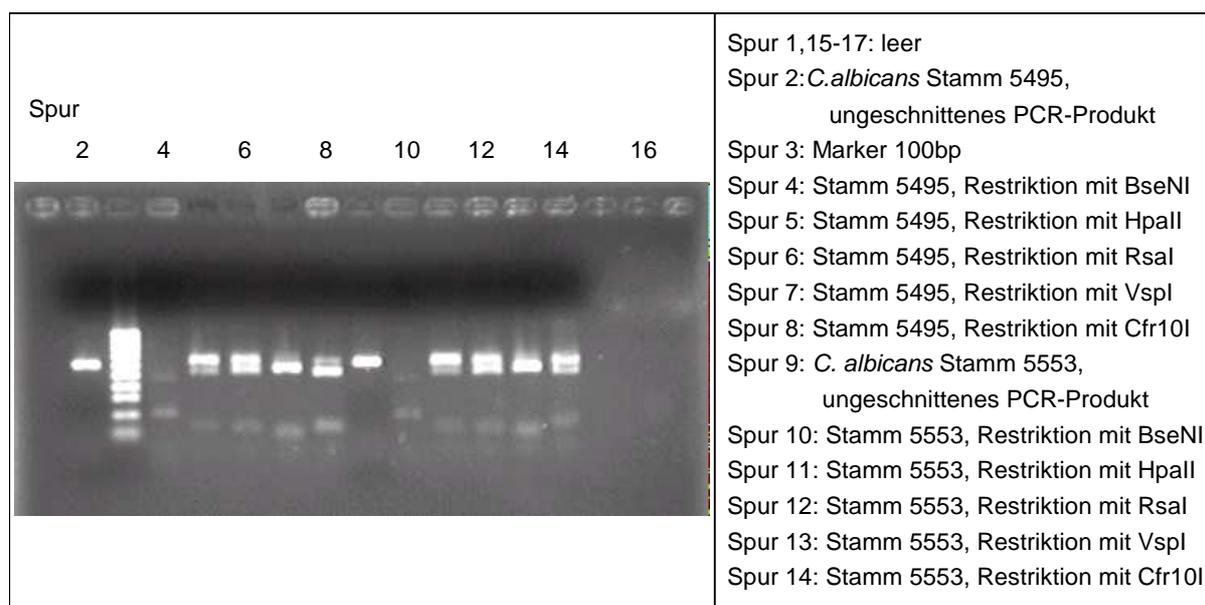


Abb. 3-12: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der *C. albicans* Stämme 5495 und 5553 nach Restriktion mit den fünf ausgewählten Enzymen

Die Banden der DNA-Fragmente nach Restriktion mit BseNI zeigen die erwartete Lauflänge von 424 und 173 bp. Das Schnittmuster nach Restriktion mit dem Enzym HpaII enthält neben der Bande des ungeschnittenen PCR-Produkts bei 600 bp Banden der DNA-Fragmente von etwa 500 und 100 bp. Ein dazu identisches Schnittmuster zeigt sich nach Restriktion mit dem Enzym RsaI. Die vierte Restriktionsendonuklease VspI schneidet das amplifizierte RHO1-Gen in Fragmente einer Größe von 76 und 521 bp. Anhand der Abb. 3-12 (S.57) wird der Größenunterschied zwischen der Bande von etwa 100 bp bei den vorangegangenen zwei Enzymen und der etwas kleineren 76 bp-Bande bei VspI deutlich. Die kleinere Bande hat eine etwas längere Laufstrecke. Der Restriktionsverdau mit Cfr10I liefert DNA-Fragmente von etwa 500 und 100 bp.

Insgesamt zeigten die 29 untersuchten *C. albicans* Stämme ein identisches Ergebnis, das mit dem in der Abb. 3-12 (S.57) dargestellten Bild vergleichbar ist. Vergleicht man die Banden der Stämme, nachdem das RHO1-Gen mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, zeigen diese identische Lauflängen.

Die RFLP-Analyse des RHO1-Gens von *C. albicans* mit 5 Restriktionsenzymen ergab also keinen Nachweis von Mikroheterogenitäten.

3.5 Nachweis des RHO1-Gens in ausgewählten *Candida* Spezies und *Trichosporon mucoide*

In der derzeitigen Literatur gibt es keine Hinweise zu Untersuchungen über das Vorhandensein des RHO1-Gens bei anderen *Candida*-Spezies außer *C. albicans*. Da aber die Bedeutung anderer *Candida* Spezies, wie beispielsweise *C. glabrata* oder *C. tropicalis*, v.a. bei Patienten mit verminderter Resistenz im klinischen Alltag zunehmend größer wird, schien dieser Ansatzpunkt auch im Hinblick auf die Nutzung von Forschungsergebnissen für die Klinik nicht uninteressant zu sein, weil man aus diesem Ergebnis entsprechende identische therapeutische Ansätze ableiten könnte.

3.5.1 Prüfung der Stämme auf das Vorkommen des RHO1-Gens

Die 12 Stämme (s.Tab. 2-9; S.30) wurden als Stammkultur auf Sabouraud-Platten zur Verfügung gestellt. Von jedem Stamm wurde eine „klassische“ DNA-Präparation durchgeführt und untersucht, ob die Amplifizierung des RHO1-Gens möglich ist. Aufgrund von Erfahrungswerten aus der Arbeitsgruppe wurden die PCR-Bedingungen geringfügig zu den vorangegangenen Experimenten verändert. Die Annealingtemperatur wurde von bisher 45°C auf 40°C gesenkt (s.Tab. 2-11, S.35). Die Anzahl der durchgeführten Zyklen und die Konzentrationen der PCR-Reagenzien pro Reaktionsansatz (s. Tab. 2-10; S.34) blieben unverändert. Das Primerpaar 1/2, das zum Nachweis des RHO1-Gens bei *C. albicans* eingesetzt worden war, wurde auch weiterhin verwendet. Es wurde jeweils 1 µl der DNA-Lösung pro PCR-Reaktionsansatz eingesetzt und das Ergebnis der PCR wie bisher mittels nachfolgender Gelelektrophorese kontrolliert.

In der Abb. 3-13 (S.59) wird das Ergebnis der PCR der folgenden vier Stämme:

C. guilliermondii DSM 6381, *C. norvegensis* DSM 70760, *C. sake* DSM 70763 und *C. lusitaniae* DSM 70102 veranschaulicht. Als Positivkontrolle diente der *C. albicans* Stamm P 9484, von dem bekannt war, dass er das RHO1-Gen besitzt.

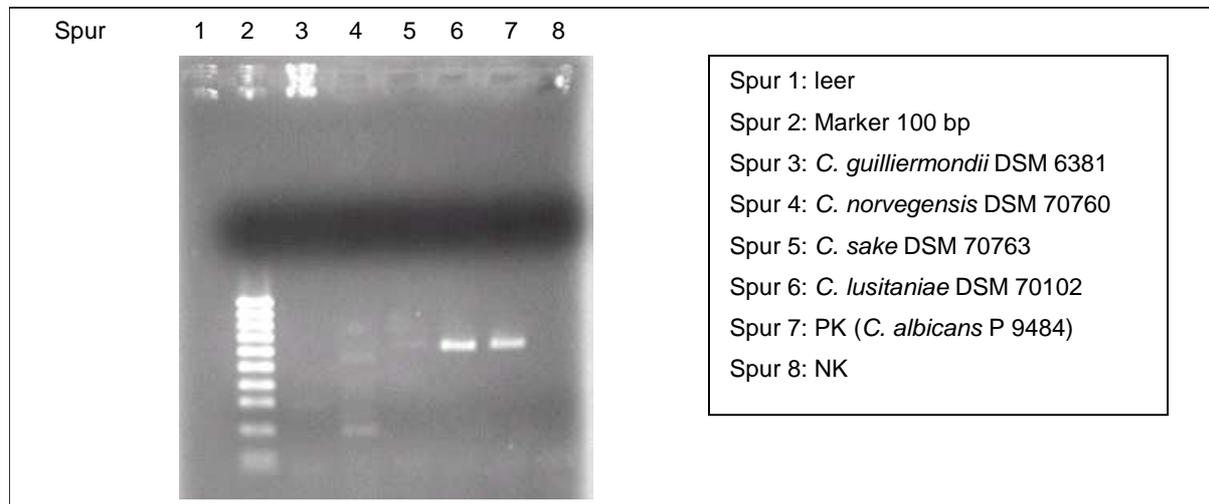


Abb. 3-13: Elektropherogramm nach PCR der Stämme *C. guilliermondii* DSM 6381, *C. norvegensis* DSM 70760, *C. sake* DSM 70763 und *C. lusitaniae* DSM 70102 mit dem Primerpaar $\frac{1}{2}$ zum Nachweis des RHO1-Gens

Eine im Vergleich zur Positivkontrolle identische und damit RHO1-ähnliche Bande bei 600 bp zeigt das PCR-Produkt des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102.

In einer weiteren Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte der acht anderen Stämme (s.Tab. 2-1; S.30) aufgetragen. Dieses Agarosegel ist in der Abb. 3-14 (S.60) wiedergegeben.

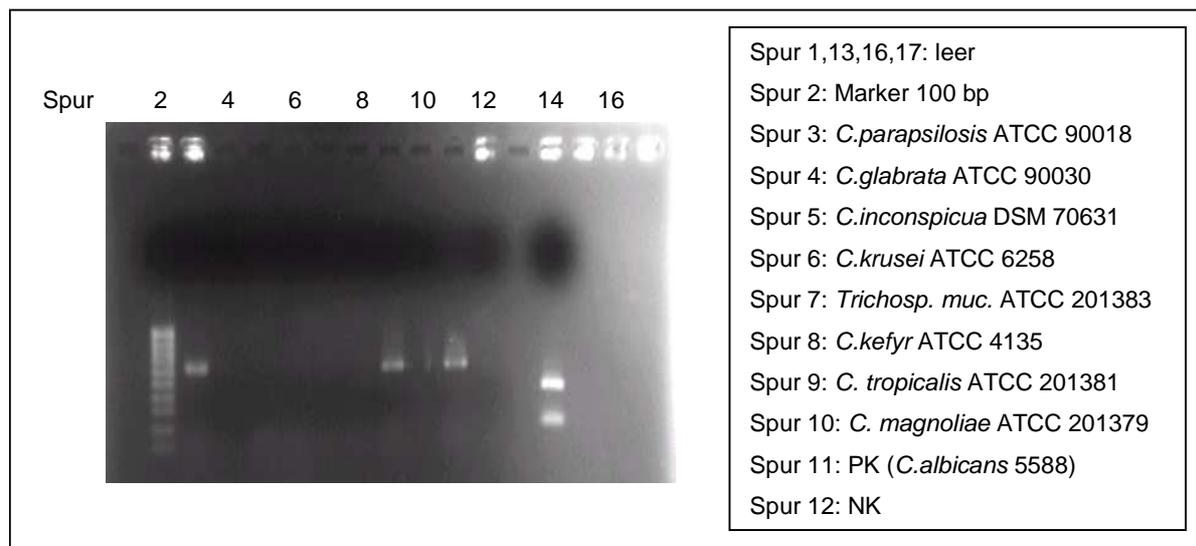


Abb. 3-14: Elektropherogramm nach PCR mit dem Primerpaar $\frac{1}{2}$ zur Amplifizierung des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida* Spezies und *Trichosporon mucoide*

In der Spur 11 ist der *C. albicans* Stamm 5588 als Positivkontrolle aufgetragen, es zeigt sich die Bande des amplifizierten RHO1-Gens bei 600 bp. Eine im Vergleich dazu identische Bande ist für die Stämme *Candida parapsilosis* ATCC 90018 und *Candida tropicalis* ATCC 201381 zu erkennen. Von den anderen Stämmen war keine Bande sichtbar.

Von den folgenden neun Spezies, bei denen das RHO1-Gen nicht amplifiziert werden konnte: *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, *C. sake*, *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *Trichosporon mucoide*, *C. kefyr*, *C. magnoliae* wurde die DNA erneut mit Natriumacetat gefällt und mit Ethanol gewaschen, um eine höhere Reinheit der DNA zu erhalten und eventuelle Phenolchloroformverunreinigungen zu entfernen. Im Anschluß daran erfolgte die Messung der DNA-Konzentration, wie der Tab. 3-6 (S.61) zu entnehmen ist, war in jeder Probe ausreichend DNA zur Amplifikation vorhanden.

Tab. 3-6: DNA-Konzentrationen weiterer *Candida*-Spezies

Spezies	DNA-Konzentration in µg/µl
<i>C. guilliermondii</i> DSM 6381	0,29
<i>C. norvegensis</i> DSM 70760	2,36
<i>C. sake</i> DSM 70763	0,06
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	0,11
<i>C. inconspicua</i> DSM 70631	0,4
<i>C. krusei</i> ATCC 4135	0,81
<i>Trichosporon mucoide</i> ATCC 201383	0,35
<i>C. kefyr</i> ATCC 4135	0,57
<i>C. magnoliae</i> ATCC 201379	0,02

Mit dieser gereinigten DNA wurde die PCR unter identischen Bedingungen wiederholt. Wie aus der Abb. 3-15 (S.61) deutlich wird, war erneut nur von der Positivkontrolle die Bande des amplifizierten RHO1-Gens bei 600 bp erkennbar.

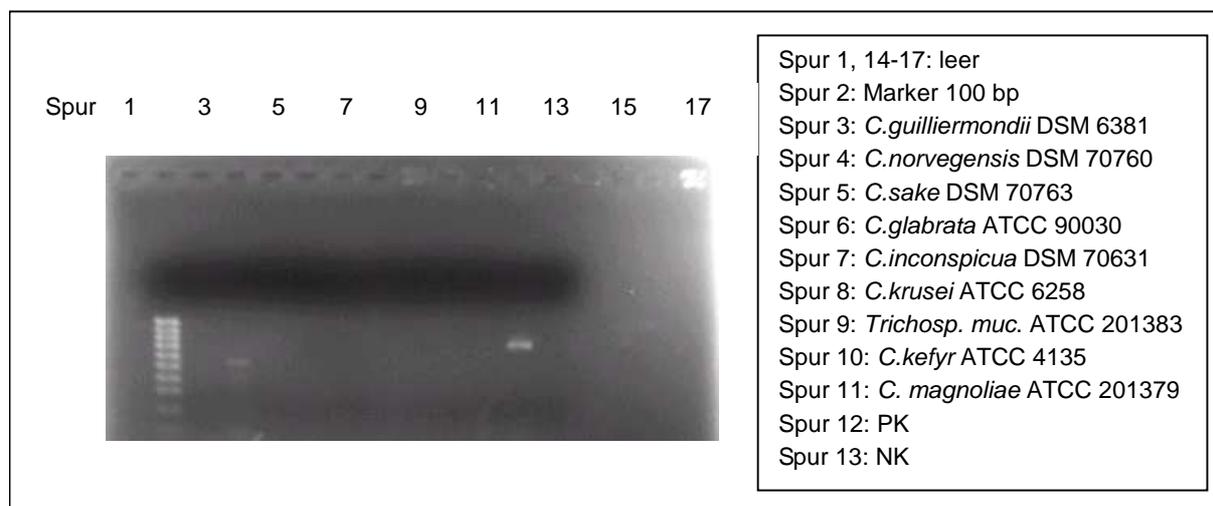


Abb. 3-15: Elektropherogramm nach erneuter Reinigung der DNA und Wiederholung der PCR mit dem Primerpaar $\frac{1}{2}$ zur Amplifizierung des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida*-Spezies und *Trichosporon mucoide*

Außerdem zeigt sich bei *C. norvegensis* eine Bande von etwa 500 bp. Insgesamt ist festzustellen, dass bei diesen neun Spezies erneut keine Amplifizierung des RHO1-Gens möglich war.

Die Zusammenfassung dieser Versuchsergebnisse ermöglicht folgende Feststellungen:

Von den 12 untersuchten Spezies war nur bei den drei Spezies *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* eine RHO1-ähnliche Bande bei 600 bp nachweisbar. Zur vergleichenden Dokumentation dieses Ergebnisses wurde von den Proben der 12 Spezies erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt wie in Abb. 3-16 (S.62) dargestellt ist.

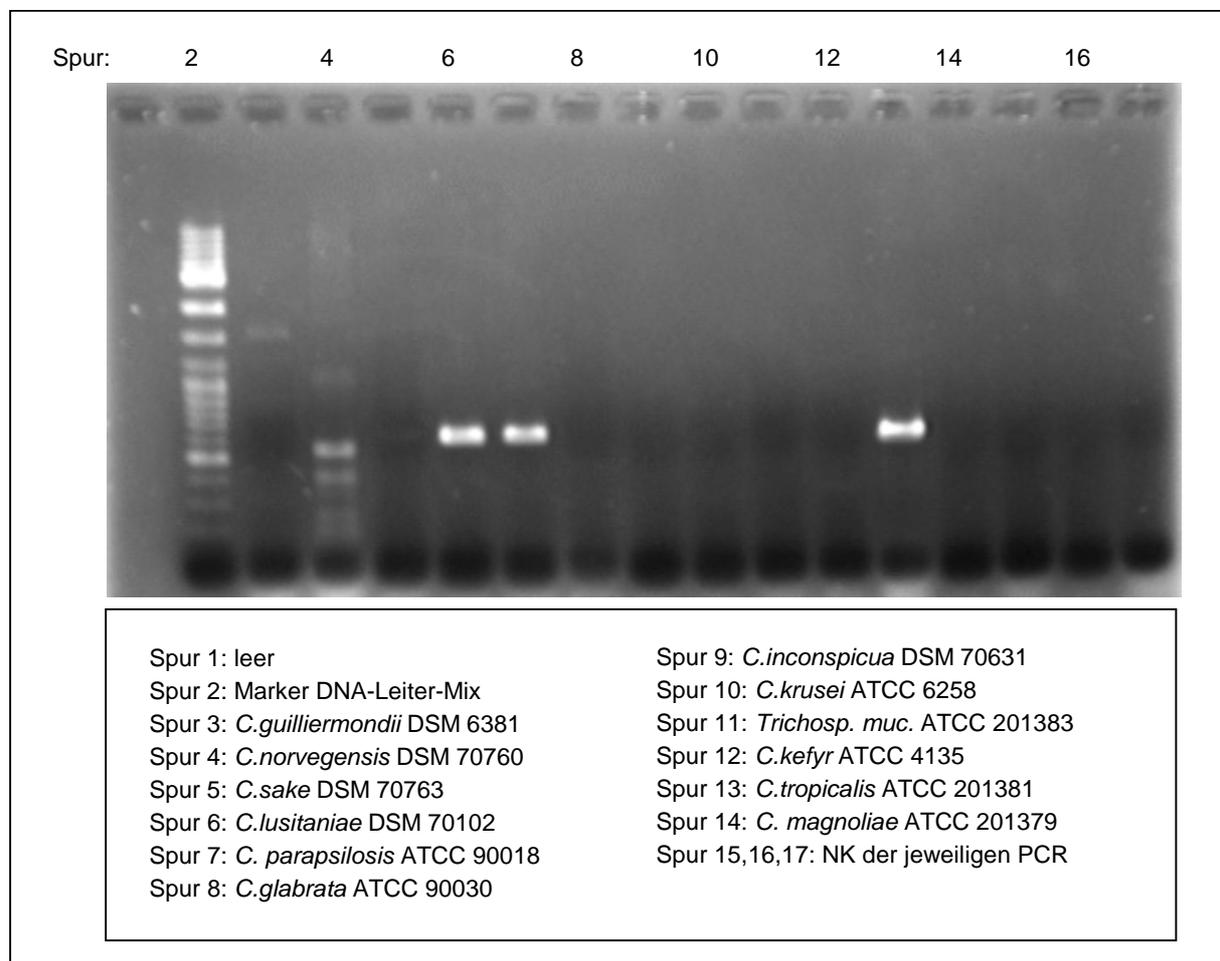


Abb. 3-16: Elektropherogramm amplifizierter DNA nach PCR mit dem Primerpaar $\frac{1}{2}$ bei verschiedenen *Candida*-Spezies und *Trichosporon mucoide* - Nachweis einer RHO1-ähnlichen Bande bei drei *Candida*-Spezies

Nur von den Stämmen *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 sind RHO1-ähnliche Banden bei 600 bp zu erkennen.

Die Ergebnisse führten zu der Frage, ob die negativen Ergebnisse richtig oder falsch negativ sind, ob also das RHO1-Gen bei diesen Pilz-Spezies nicht vorkommt oder die präparierte DNA nicht amplifizierbar ist?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde von der gereinigten DNA der neun Spezies eine PCR mit einem anderen Primer-Paar bei ansonsten unveränderten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Als Primer wurden erneut die Oligonukleotide 153/154 verwendet. Das Bild der Gelelektrophorese zeigt die Abb. 3-17 (S.63).

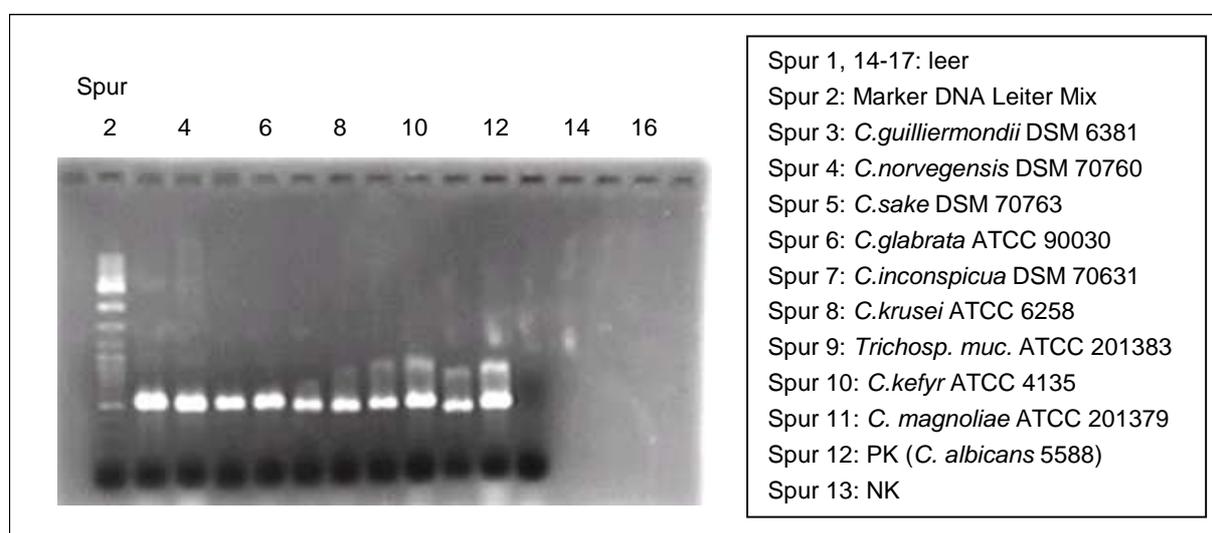


Abb. 3-17: Elektropherogramm amplifizierter DNA verschiedener *Candida*-Spezies und *Trichosporon mucoide* nach PCR mit dem Primerpaar 153/154

Es ist von jeder Spezies eine Bande bei 500 bp, der zu erwartenden Größe des Amplikons [50] erkennbar. Damit ist bewiesen, dass die DNA der ausgewählten Stämme der neun verschiedenen Spezies amplifizierbar ist.

Durch dieses Ergebnis wurde gezeigt, dass das negative Ergebnis des vorangegangenen Experimentes darauf zurückzuführen ist, dass die für die Amplifizierung des RHO1-Gens spezifischen Primer nicht binden konnten und somit die Zielsequenz der beiden oder eines der RHO1-Primer bei diesen Pilz-Spezies wahrscheinlich nicht vorkommt.

3.5.2 Bestätigung des Nachweises eines RHO1-ähnlichen Musters bei weiteren Stämmen der *Candida* Spezies: *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*

Das in der Abb. 3-16 (S.62) dargestellte Ergebnis des Nachweises einer dem RHO1-Gen bei *C. albicans* vergleichbaren Bande bei 600 bp bei den Stämmen:

- *C. lusitaniae* DSM 70102,
- *C. parapsilosis* ATCC 90018 und
- *C. tropicalis* ATCC 201381

sollte in weiteren Experimenten bestätigt werden. Das Ziel ist die Überprüfung, dass dieses Ergebnis kein Zufall war, sondern das es auch bei anderen Stämmen dieser Spezies bestätigt werden kann.

Dafür wurden Patientenstämme des mykologischen Labors des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene der Charité ausgesucht. Die Tab. 2-1 (S.23) zeigt u.a. eine Auflistung der ausgewählten Stämme der drei *Candida*-Spezies *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis*.

Von der Übernachtsschüttelkultur (s.2.2.2; S.30) dieser Stämme wurde jeweils eine „klassische“ DNA-Präparation (s.2.2.3.4; S.32) mit anschließender PCR zur Amplifizierung des RHO1-Gens durchgeführt. Die Annealingtemperatur von 40°C wurde bei ansonsten unveränderten PCR-Reaktionsbedingungen (s.Tab. 2-11; S.35) beibehalten. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Gelelektrophorese dokumentiert und ist in den Abb. 3-18 (S.65) und Abb. 3-19 (S.65) dargestellt.

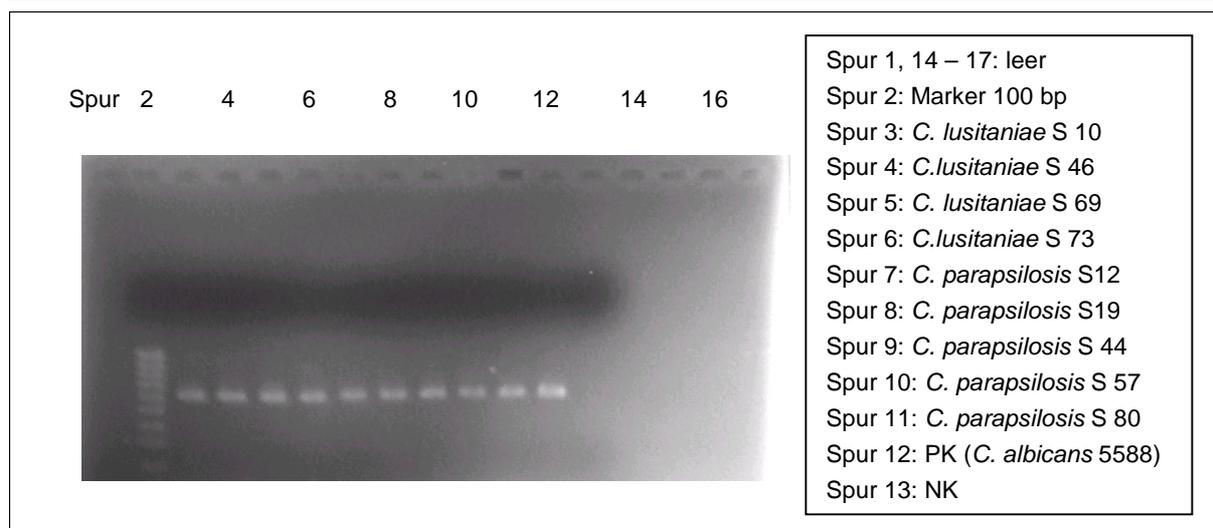


Abb. 3-18: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens bei verschiedenen Stämmen der Spezies: *C. lusitaniae* und *C. parapsilosis*

Bei den in den Spuren drei bis elf aufgetragenen Stämmen wurde ein DNA-Fragment von 600 bp, dem erwarteten PCR-Produkt des RHO1-Gens, amplifiziert.

Die Abb. 3-19 (S.65) zeigt das Ergebnis der zehn *C. tropicalis* Stämme (s.Tab. 2-1; S.23). Das RHO1-Gen konnte bei einem Stamm nicht amplifiziert werden, wie aus der fehlenden Bande des PCR-Produkts des Stammes *C. tropicalis* S 14 in Bahn 3 zu erkennen ist. Bei den anderen *C. tropicalis*-Stämmen und der Positivkontrolle ist jeweils bei 600bp, dem erwarteten PCR-Produkt des RHO1-Gens, eine deutliche Bande erkennbar.

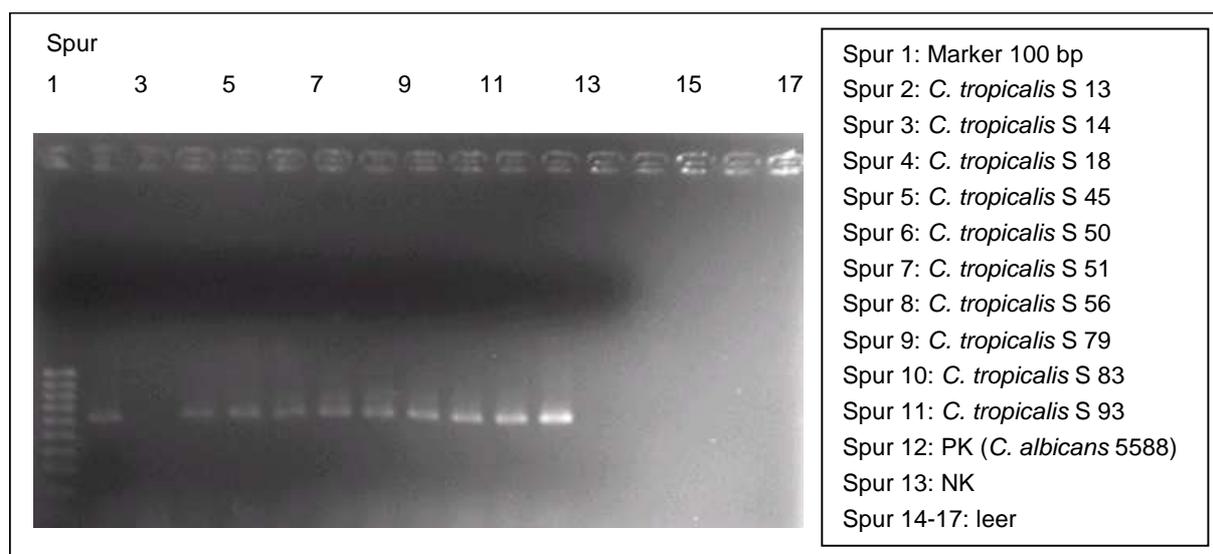


Abb. 3-19: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens bei verschiedenen Stämmen der Spezies: *C. tropicalis*

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei vier weiteren *C. lusitaniae*-Stämmen, fünf Stämmen von *C. parapsilosis* und neun Stämmen der Spezies *C. tropicalis* eine dem PCR-Produkt des RHO1-Gens entsprechende Bande nachgewiesen werden konnte, womit bewiesen ist, dass das im Abschnitt 3.5.1 (S.58) dargestellte Ergebnis typisch für die jeweilige Spezies war. Allerdings war bei dem *C. tropicalis* Stamm S 14 der Nachweis des RHO1-Gens nicht möglich. Zur Kontrolle, ob die DNA dieses Stammes mit anderen Primern amplifizierbar ist, wurde eine PCR mit dem Primerpaar 153/154 durchgeführt. Außerdem erfolgte eine Wiederholung der PCR zur Amplifizierung des RHO1-Gens. Das Ergebnis beider PCR's veranschaulicht die Abb. 3-20 (S.66).

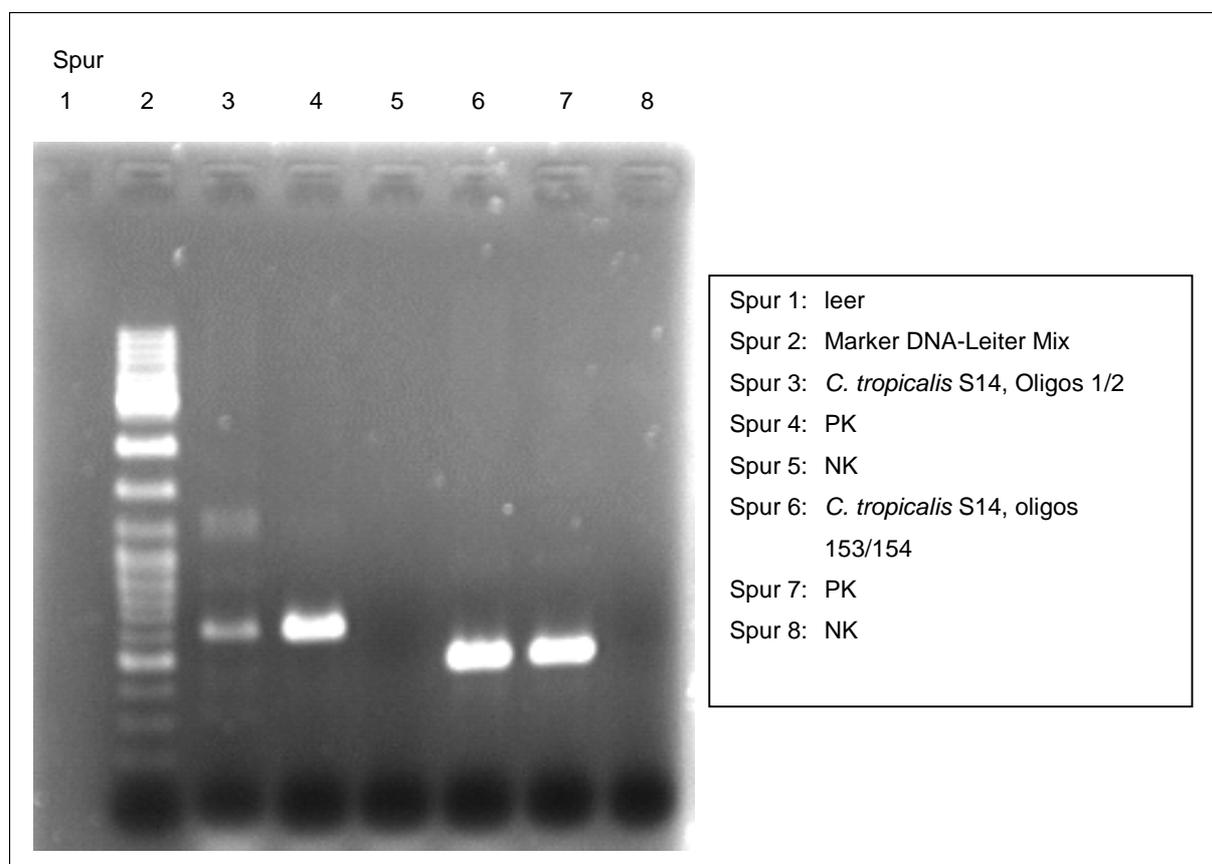


Abb. 3-20: Elektropherogramm amplifizierter DNA des Stammes *C. tropicalis* S14 mit den Primerpaaren 1/2 und 153/154

Man erkennt in der Spur 3 eine Bande bei 600 bp, so dass in der Wiederholung die Amplifizierung des RHO1-Gens auch bei diesem Stamm erfolgreich war. Die kräftige Bande von 500 bp nach Amplifikation mit dem Primerpaar 153/154 ist in der Bahn 6 erkennbar.

Damit konnte das Ergebnis des Nachweises des RHO1-Gens bei den drei Spezies:

C. lusitaniae, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* ausnahmslos bewiesen werden.

3.5.3 Vergleich der Schnittbilder nach Restriktion des RHO1-Gens mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen innerhalb der *Candida* Spezies

In den Abb. 3-13 (S.59) und Abb. 3-14 (S.60) ist zwischen der Bande des amplifizierten RHO1-Gens von *C. albicans* und den Banden der Stämme *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 kein signifikanter Unterschied zu erkennen, so dass behauptet werden kann, dass es sich sehr wahrscheinlich um die Bande des amplifizierten RHO1-Gens handelt. An dieser Stelle erhebt sich die Frage, ob sich auch die Schnittmuster der DNA-Fragmente nach Restriktion des RHO1-Gens der *Candida* Spezies untereinander gleichen oder ob es zu Abweichungen kommt, die auf Unterschiede in der DNA-Sequenz hinweisen könnten.

Von den drei Stämmen: *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 wurde jeweils 1 µl gereinigter DNA mit einer Konzentration von 0,02 µg/µl pro 100 µl PCR-Reaktionsvolumen (s.Tab. 2-10; S.34) eingesetzt. Die Amplifizierung des RHO1-Gens unter den bekannten PCR-Reaktionsbedingungen (s.Tab. 2-11;S.35) wurde mittels Gelelektrophorese dokumentiert. Für die Restriktion der gereinigten PCR-Produkte (s.2.2.4.2; S.35) wurden wiederum die fünf Restriktionsendonukleasen: BseNI, Cfr10I, HpaII, RsaI und VspI eingesetzt. Im Vergleich zur Restriktion der *C. albicans* Stämme wurden die Reaktionsbedingungen für das Enzym BseNI geringfügig verändert, es wurde in einer Konzentration von 5 U/Ansatz verwendet und das Volumen des Gesamtansatzes von 20 µl auf 30 µl erhöht. In der Gelelektrophorese zur Dokumentation des Restriktionsergebnisses wurden vergleichbare DNA-Mengen des geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkts eingesetzt.

Die Abb. 3-21 (S.68) veranschaulicht das Schnittmuster nach Restriktion des RHO1-Gens des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102.

Die Banden der DNA-Fragmente nach Restriktion mit BseNI zeigen eine Lauflänge von etwa 480 bp und 130 bp, was auf einen Unterschied zur Fragmentgröße bei *C. albicans* hindeutet. Die Restriktion mit HpaII liefert Fragmente mit einer Größe von 500 und 100 bp, es ist jedoch nicht die gesamte DNA-Menge geschnitten worden, was an der Bande bei 600 bp zu erkennen ist. RsaI schneidet das RHO1-Gen in Fragmente mit einer Größe von etwa 480 und 130 bp. Nach Restriktionsverdau mit VspI ist nur die Bande ungeschnittener DNA bei 600 bp zu erkennen, so dass dieses Enzym anscheinend nicht geschnitten hat. Das Schnittmuster des fünften Restriktionsenzym Cfr10I gleicht dem bekannten Bild von *C. albicans* mit Banden bei etwa 500 und 100 bp.

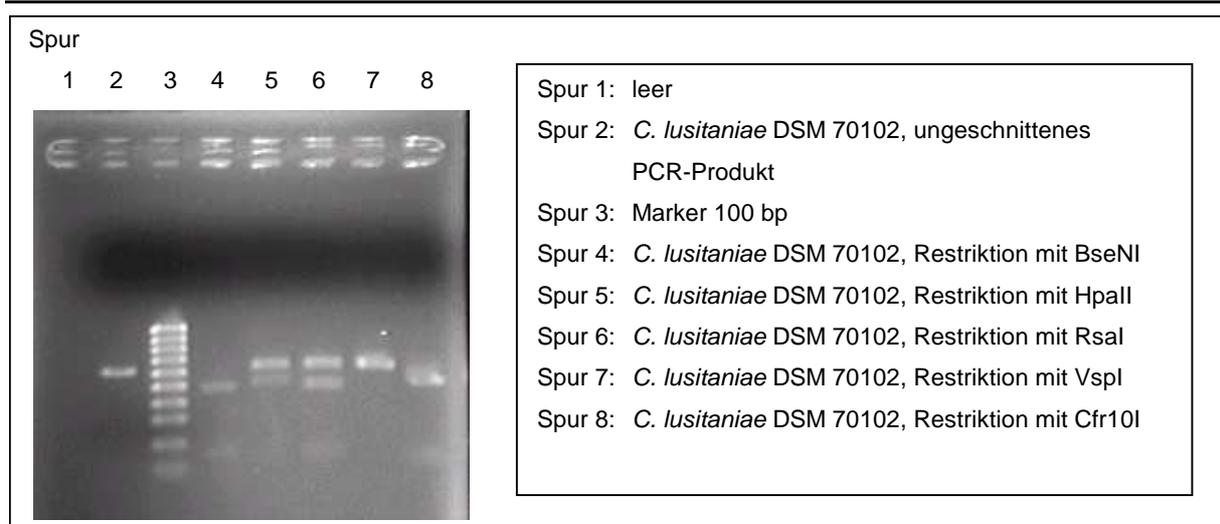


Abb. 3-21: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 nach Restriktion

Die Schnittmuster nach Restriktion des RHO1-Gens der Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 veranschaulicht die Abb. 3-22 (S.69).

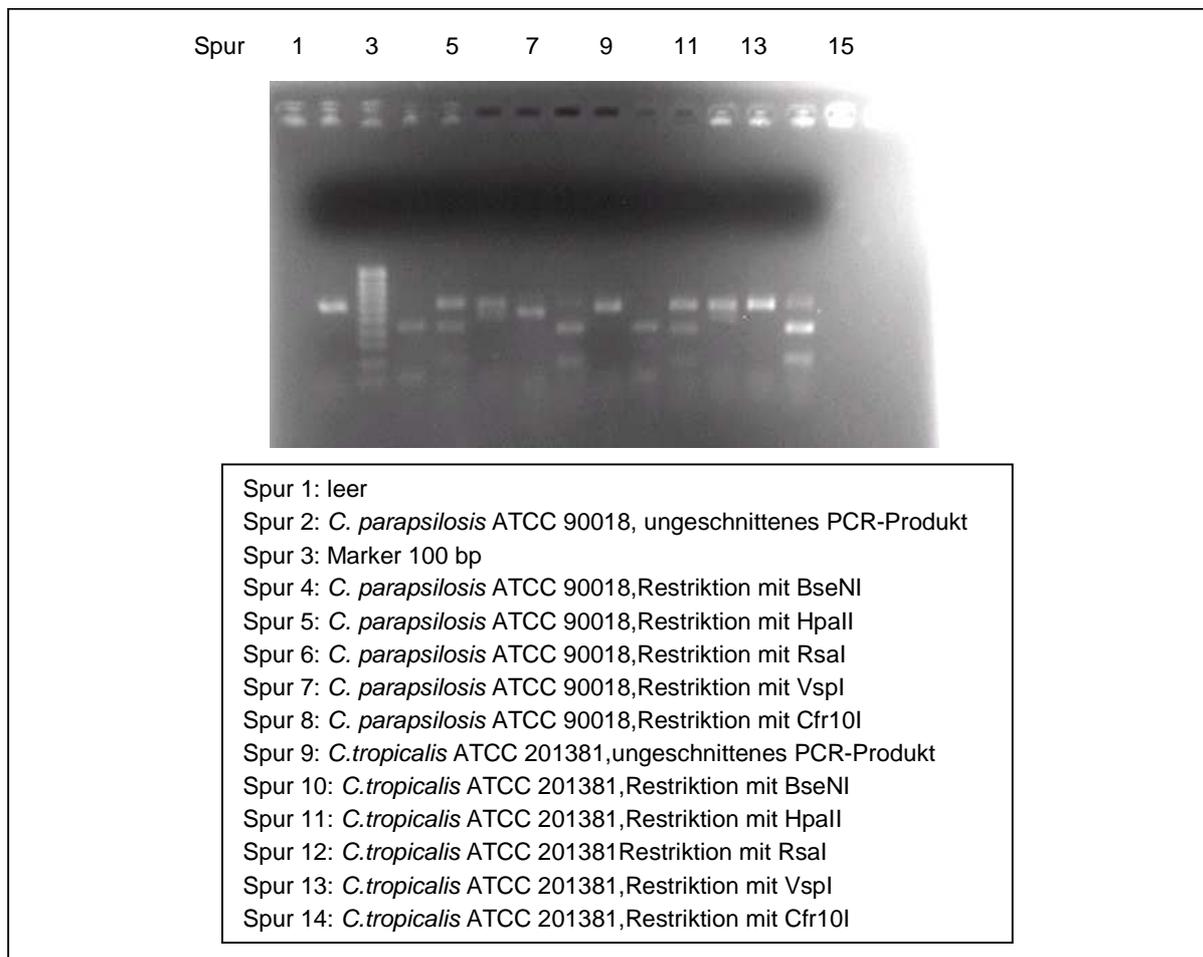


Abb. 3-22: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion

Wie in Abb. 3-22 (S. 69) dargestellt, zeigen sich bei beiden Spezies nach Restriktion mit BseNI, HpaII, RsaI und Cfr10I identische Größen der DNA-Fragmente. Ein Unterschied zwischen beiden Spezies zeigt sich nach Restriktion des PCR-Produkts mit VspI. Das amplifizierte RHO1-Gen des *C. parapsilosis* Stammes wurde in DNA-Fragmente von etwa 520 und 100 bp geschnitten, während bei dem *C. tropicalis* Stamm nur die Bande der ungeschnittenen DNA bei 600 bp zu sehen ist.

Die Auswertung der Ergebnisse der Restriktion der drei Spezies zeigt Unterschiede für das Enzym VspI, wie der Abb. 3-23 (S.69) zu entnehmen ist.

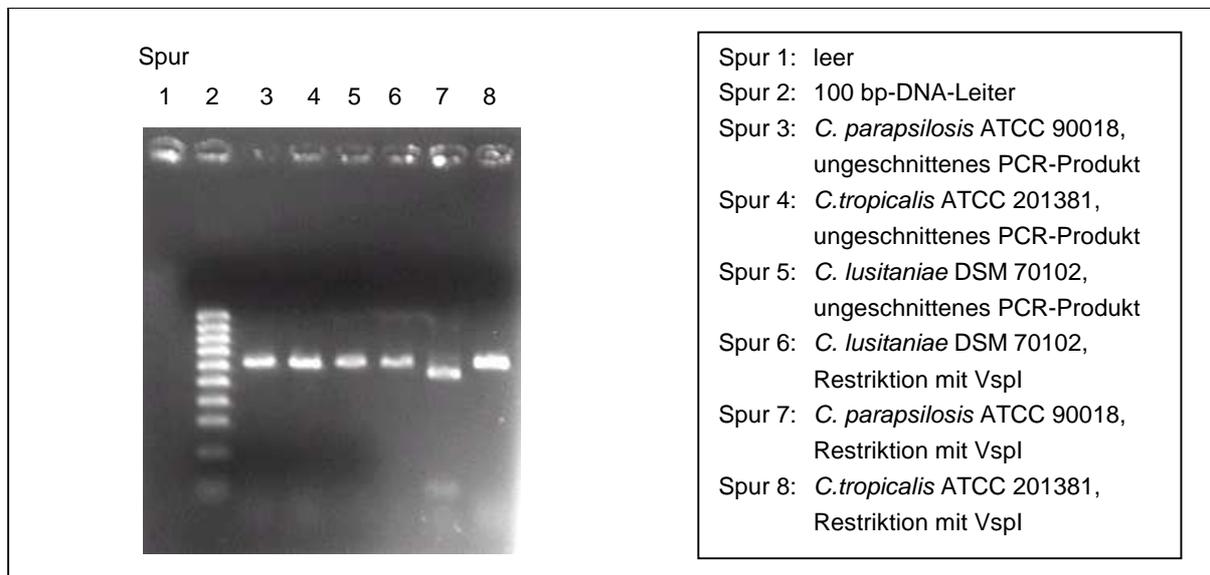


Abb. 3-23: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit VspI

In diesem direkten Vergleich ist eindeutig erkennbar, dass das Restriktionsenzym VspI nur bei dem *C. parapsilosis* Stamm geschnitten hat, was auf Sequenzunterschiede innerhalb des RHO1-Gens zwischen den Spezies und im Vergleich zu *C. albicans* hinweist.

Die Abb. 3-24 (S.70) zeigt das Bild der verschiedenen *Candida*-Spezies nach Restriktion mit HpaII.

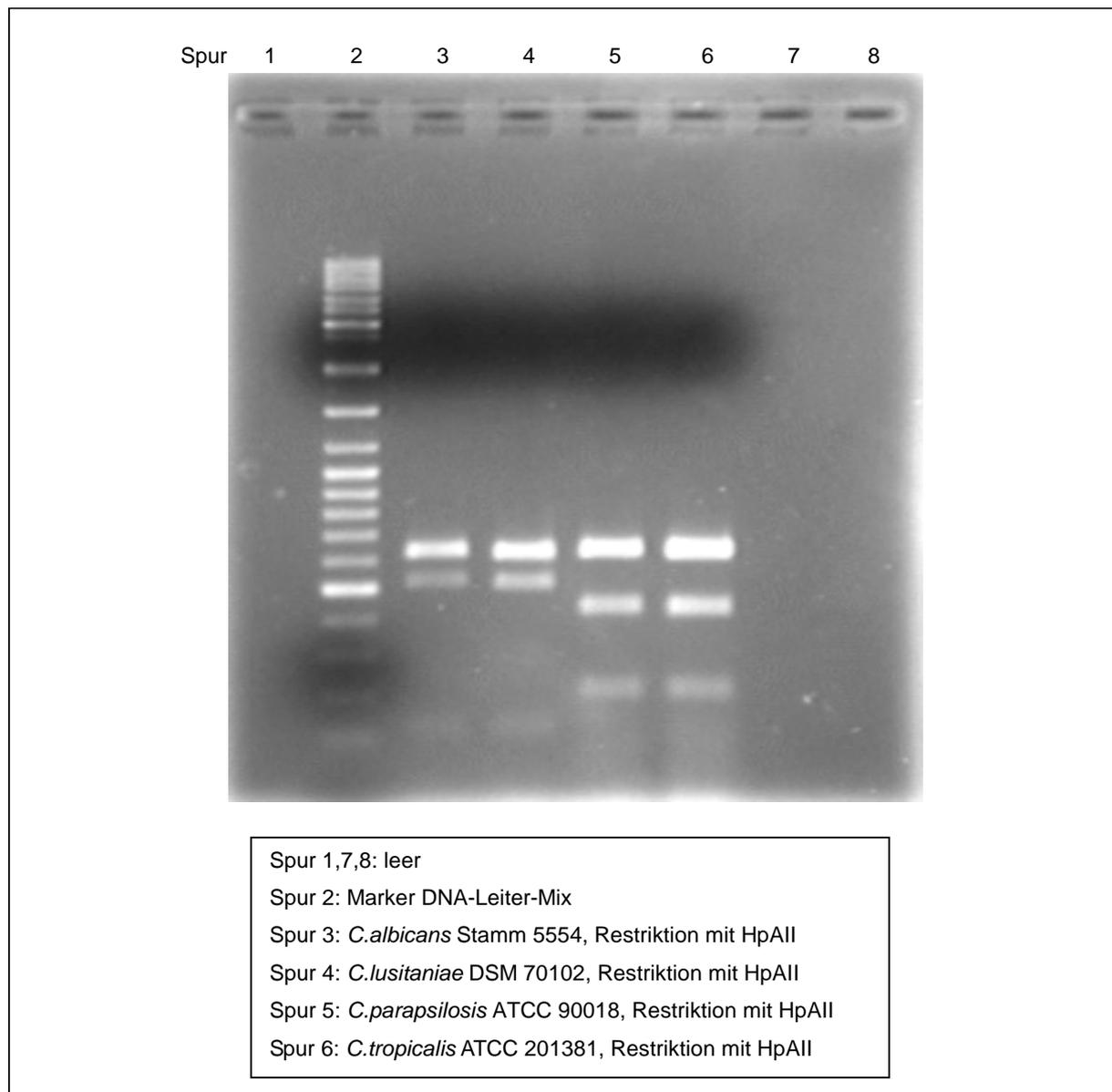


Abb. 3-24: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5554, *C. lusitanae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit HpaII

Bei dem *C. albicans* Stamm 5554 liefert die Restriktion mit HpaII DNA-Fragmente von etwa 520 und 120 bp, außerdem ist die Bande der ungeschnittenen DNA bei etwa 620 bp zu erkennen. Die erwartete Lauflänge der DNA-Fragmente lag bei 500 und 97 bp, so dass die Probe etwas zu kurz gelaufen ist, aber insgesamt gesehen dem erwarteten Muster entspricht. Ein im Vergleich dazu identisches Bild zeigt der *C. lusitanae* Stamm. Dagegen zeigt sich bei den Spezies *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* ein davon abweichendes

Schnittmuster. Die DNA-Fragmente haben eine Größe von etwa 420 und 210 bp. Da nicht das gesamte PCR-Produkt geschnitten wurde, ist ebenfalls eine Bande bei 620 bp zu sehen. Den Vergleich der Schnittmuster nach Restriktion mit Cfr10I verdeutlicht die Abb. 3-25 (S.71).

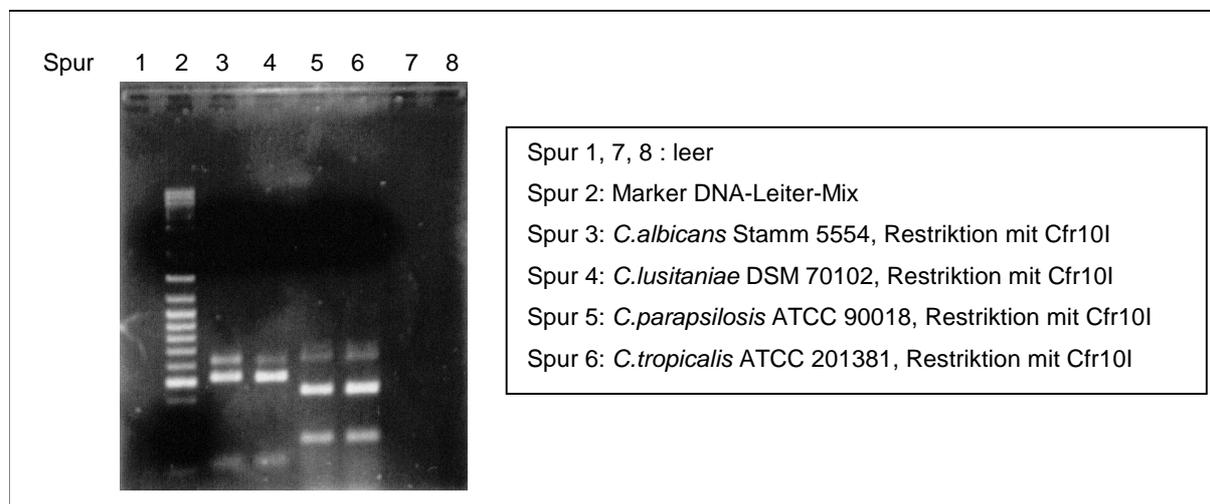


Abb. 3-25: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5554, *C. lusitanae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit Cfr10I

Interessanterweise zeigt auch dieses Bild ein identisches Schnittmuster für die Spezies *C. albicans* und *C. lusitanae* und ein anderes Schnittmuster für die Spezies *C. parapsilosis* und *C. tropicalis*, deren Banden wiederum ein identisches Bild ergeben. Bei allen Stämmen wurde erneut nicht das gesamte PCR-Produkt geschnitten. Die DNA-Fragmente der Spezies *C. albicans* und *C. lusitanae* haben eine Lauflänge von etwa 510 und 110 bp, dies entspricht der erwarteten Fragmentgröße für *C. albicans* von 499 und 98 bp. Die anderen zwei Spezies zeigen dagegen Fragmentgrößen von etwa 400 und 200 bp.

Da trotz wiederholt durchgeführter Gelelektrophoresen des mit RsaI und BseNI geschnittenen amplifizierten RHO1-Gens keine eindeutige Differenzierung der Banden im Bereich von etwa 80 bis 100 bp möglich war, wurden einige Änderungen im Versuchsaufbau vorgenommen. Nach erneuter Amplifizierung des RHO1-Gens erfolgte eine Reinigung der PCR-Produkte mit dem PCR-Purification-Kit (s.2.2.4.3; S.36). Außerdem wurde die Konzentration des Enzyms RsaI auf 1U/Ansatz erhöht. Das Volumen des Gesamtansatzes für die Restriktion betrug 20 µl, wobei die Menge des enthaltenen PCR-Produkts von bisher 5 µl auf 8 µl gesteigert wurde. Analog dazu wurde für BseNI die DNA-Menge auf 12 µl

erhöht, bei einem Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes von 30 µl. Zur Dokumentation des Ergebnisses wurden 2,5%ige Agarosegele verwendet, um eine bessere Differenzierung der Banden im unteren bp-Bereich zu erreichen.

Das Ergebnis nach Restriktion des amplifizierten RHO1-Gens mit dem Enzym RsaI zeigt die Abb. 3-26;; (S.72).

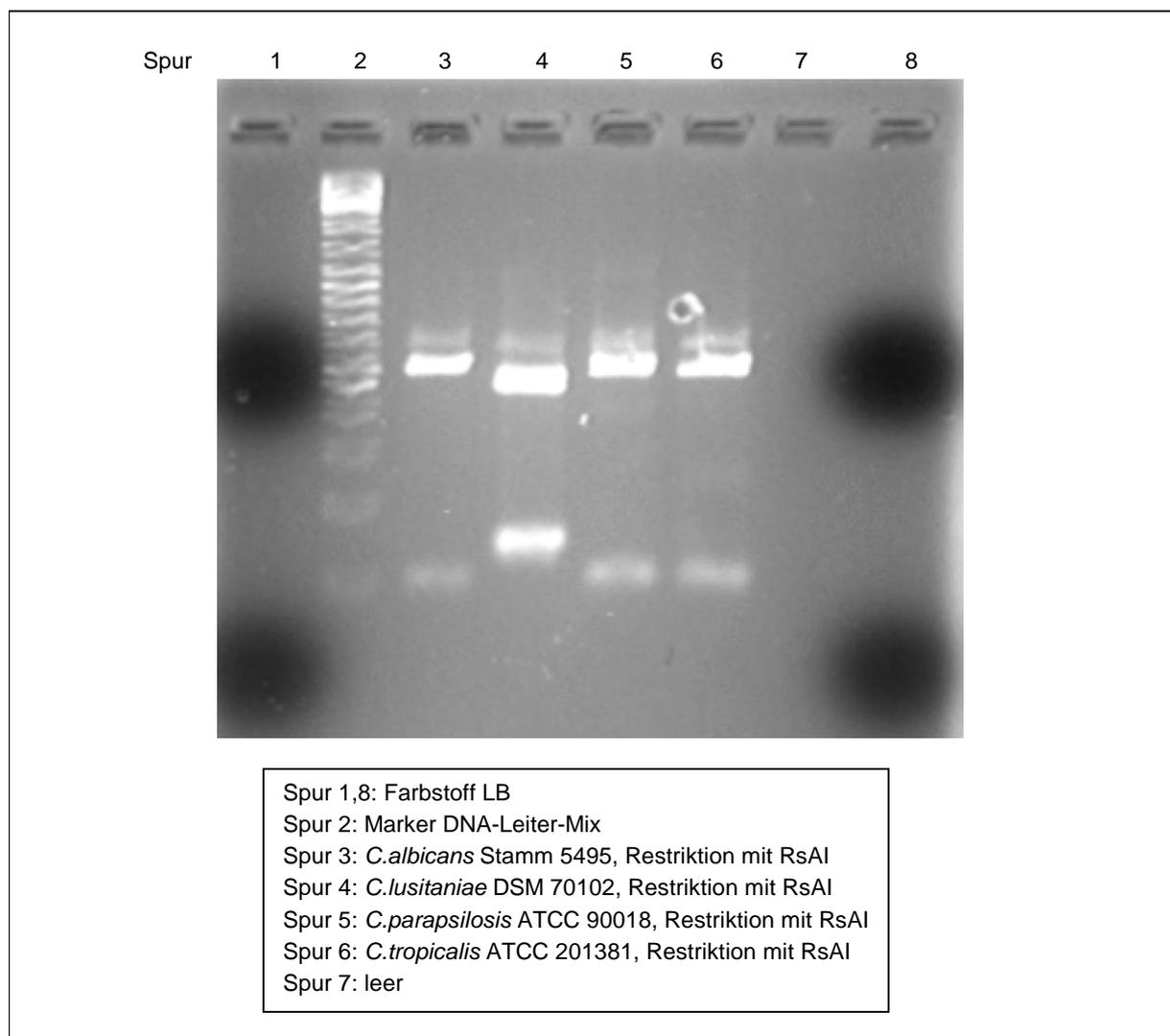


Abb. 3-26: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5495, *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit RsaI

Darin ist zu erkennen, dass die Stämme *C. albicans* 5495, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 ein identisches Schnittmuster mit DNA-Fragmenten von etwa 500 und 100 bp zeigen, dies entspricht den für *C. albicans* erwarteten Fragmentlängen von 501

und 96 bp. Im Gegensatz dazu liegt die Größe der DNA-Fragmente des *C. lusitaniae* Stammes DSM 70102 bei etwa 470 und 125 bp.

Wie in Abb. 3-27 (S.73) veranschaulicht wird, zeigt sich nach Restriktion des amplifizierten RHO1-Gens derselben Stämme mit dem Enzym BseNI für *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 ein identisches Schnittmuster mit einer Lauflänge der Banden bei ungefähr 450 bp, 100 bp und 90 bp. Dieses Ergebnis führt zur Vermutung, dass das Enzym innerhalb der RHO1-Gensequenz dieser Spezies mindestens zweimal schneidet, in der Darstellung der Sequenzanalyse wird dieses Ergebnis später noch näher betrachtet werden. Ein davon abweichendes Schnittbild liegt für die Stämme *C. albicans* 5495 und *C. lusitaniae* DSM 70102 vor.

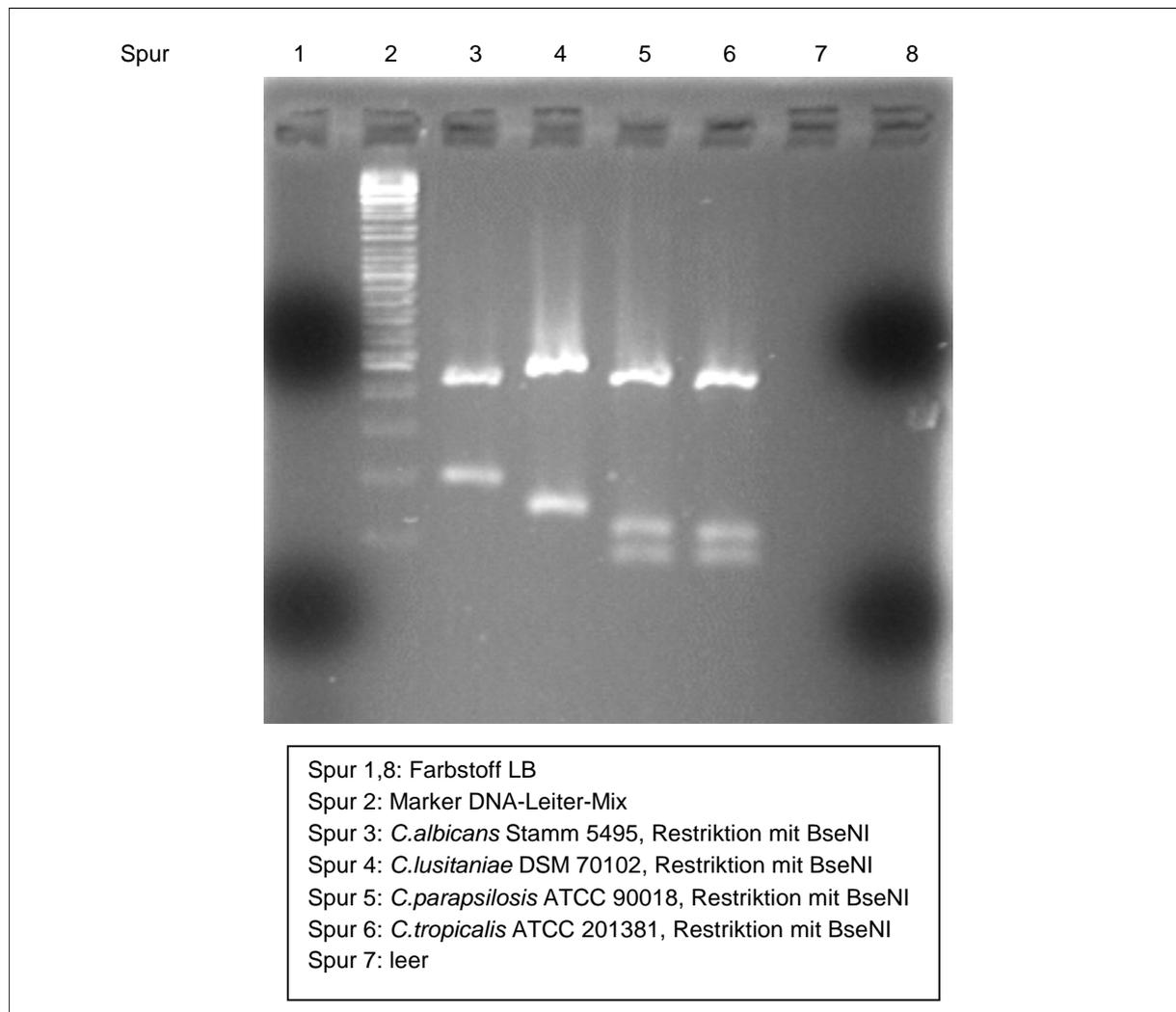


Abb. 3-27: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5495, *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit BseNI

3.6 Sequenzierung der RHO1-ähnliche Bandenmuster enthaltenden *Candida*-Spezies

Im Mittelpunkt der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse und Ausführungen steht die Klärung der folgenden Fragen:

1. Handelt es sich bei dem nachgewiesenen, zum amplifizierten RHO1-Gen von *Candida albicans* ähnlichen Bandenmuster bei den *Candida* Spezies *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* um das bei *Candida albicans* gefundene RHO1-Gen?
2. Zeigen die Sequenzen des RHO1-ähnlichen Amplikons dieser *Candida*-Spezies Abweichungen zur publizierten RHO1-Gensequenz [109] und wenn ja, betreffen diese Abweichungen bestimmte Abschnitte des Gens (hot-spots)?
3. Gibt es mit Hilfe der Sequenzanalyse eine Erklärung für die unterschiedlichen Schnittmuster bei den verschiedenen *Candida* Spezies nach Restriktion des RHO1-ähnlichen Amplikons mit den verschiedenen Restriktionsendonukleasen?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollte das RHO1-ähnliche Amplikon der drei Stämme:

- *Candida lusitaniae* DSM 70102,
- *Candida parapsilosis* ATCC 90018 und
- *Candida tropicalis* ATCC 201381

sequenziert und die Ergebnisse einer Sequenzanalyse im Vergleich zur bekannten Sequenz des RHO1-Gens bei *Candida albicans* unterzogen werden (siehe 2.2.6).

3.6.1 Darstellung der Nukleotidsequenzen der RHO1-ähnliche Muster enthaltenden *Candida* Spezies

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Chromatogramme, jeweils für die forward und reverse Sequenz eines Stammes, zur Verfügung gestellt. Die Vorgehensweise bezüglich der Auswertung der Chromatogramme und Nukleotidsequenzen wird im Abschnitt 2.2.7 (S.39) ausführlich beschrieben. Die folgende Abb. 3-28 (S.75) veranschaulicht die nach Auswertung der forward und reversen Sequenzen gebildete Konsensussequenz für jede Spezies im Vergleich zur RHO1-Sequenz von *C. albicans*.

k7_8	TGTAACGGGTTCCAAATTCACCTTCGTAGAAAAGTTGGTCATCTGTCCGGTGACGGTGC	58
k1_2_3	TTGTTACCGGT-CCAGCTG--AACTTCGTAGAAAATTAGTCAT-TGTTGGTGATGGTGC	55
k4_5_6	TACCGGT-CCAGCTG--ACCTTCGTAGAAAATTAGTCAT-NGTCGGTGATGGTGC	51
rho1.komplet	ATGGTTAACGGT-CCAGCTG--AACTTCGTAGAAAATTAGTCAT-TGTCGGTGATGGTGC	56
k7_8	TTGTGGTAAGACCTGTCTTTTGATTGTTTTCTCCAAGGGCACTTTCCAGAAAGTNTATGT	118
k1_2_3	CTGTGGTAAGACTTGTTTATTAATTGTATTTTCCAAAGGTACATTCCCAGAGGTATATGT	115
k4_5_6	TTGTGGTAAAACCTGTTTGTGATTGTTTTCTCAAAGGTACTTTCCAGAAAGTTTACGT	111
rho1.komplet	TTGTGGTAAGACTTGTTTATTAATTGTTTTTCAAAGGTACTTTCCAGAAAGTTTATGT	116
k7_8	TCCAACCGTTTTTCGAGAATTACGTTGCTGATGTCGAGGTCGATGGCAGAAAAGTCAATT	178
k1_2_3	TCCCACAGTTTTTTGAAAATTAATGTTGCTGATGTTGAAGTTGATGGAAGAAAAGTTGAGTT	175
k4_5_6	CCCAACAGTTTTTTGAAAATTAATGTTGCTGATGTCGAAGTCGATGGTAGAAAAGTTGAATT	171
rho1.komplet	CCCAACAGTTTTTTGAAAATTAATGTTGCTGATGTTGAAGTTGATGGTAGAAAAGTTGAATT	176
k7_8	GGCCCTTTGGGATAGTGC GGTCAGGAAGATTACGACAGATTGAGACCTTTGTCTTACCC	238
k1_2_3	GGCACTTTGGGATACTGCCGGTCAAGAAGATTACGATAGATTAAGACCATTATCATAACCC	235
k4_5_6	GGCCTTATGGGATACCGCCGGTCAAGAAGATTACGATAGATTAAGACCTTTGTCAATATCC	231
rho1.komplet	GGCATTATGGGATACTGCTGGTCAAGAAGATTATGATAGATTAAGACCATTATCTTATCC	236
k7_8	AGACTCCAATGTTATTTTGATTTGTTTTNTCTATTGACTCGCCAGACTCTTTGGACAATGT	298
k1_2_3	AGATTCAAATGTCATTTTGATTTGTTTTTCAGTTGATTCACCCGATTCCTTTGGATAATGT	295
k4_5_6	AGATTCCAATGTCATTTTGATTTGTTTTCTCAGTCGATTCACCAGATTCATTAGATAACGT	291
rho1.komplet	AGATTCCTAATGTTATTTTGATTTGTTTTTCAGTTGATTCACCAGATTCCTTTAGATAACGT	296
k7_8	TTTGGAGAAGTGGATTTCTGAGGTGTTGCACTTCTGCCAAGGCGTTCCCTATCATCTTGGT	358
k1_2_3	TTTGGAAAATGGATCTCAGAAGTTTTGCATTTCTGTCAAGGTGTCCCATTAATCTTGT	355
k4_5_6	CTTAGAAAATGGATTTCTGAAGTTTTACATTTCTGTCAAGGTGTCCCAATCATTTTGGT	351
rho1.komplet	TTTAGAAAATGGATTTCTGAAGTTTTACATTTCTGTCAAGGTGTTCCAATCATTTTAGT	356
k7_8	TGGCTGTAAAAGTCAGACTTGAGNAACGANNACGCCACCATTCAAGGCTTTGGTCCAAGAA	418
k1_2_3	TGGTTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCCATACCATTGAAGCCTT-GAGACAACAT	413
k4_5_6	TGGTTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCACACACTATTGAAGCCTT-GAGACAACAA	409
rho1.komplet	TGGTTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCTCATACTATTGAAGCCTT-GAGACAACAA	414
k7_8	AACCAGCAACCTGTCTCTTCTTCCGAAGGTGAGGCTGTTGCTCAGAAGATTGGTACC-CA	477
k1_2_3	CAACAACANCCAGTTTTCAACTTCTGAAGGACAGGCTGTTGCTCAAAGATTGGTGTCTGCT	473
k4_5_6	CAACAACAACCAGTCTCTTCTTCTGAAGGTCAAGAAGTTGCTCAAAGAATCGGAGCTGCT	469
rho1.komplet	CAACAACAACCAGTCTCAACTTCTGAAGGTCAACAAGTTGCTCAAAGAATGGTGTCTGCT	474
k7_8	GTATTACTTGGAGTGTTCTGCTAGAACCGCCAAGGTGTCAGAGAAGTGTGTTGAAACTGC	537
k1_2_3	G-ATTATTTGGAATGTTCCGCCAAGACTGGAAGAGGAGTTAGAGAAGTGTGTTGAAGCTGC	532
k4_5_6	G-ATTACTTGGAAATGTTCTGCTAAAACCTGGTAGAGGTGTTAGAGAAGTGTGTTGAAGCTGC	528
rho1.komplet	G-ATTACTTGGAAATGTTCTGCTAAAACCGGTAGAGGTGTTAGAGAAGTGTGTTGAAGCTGC	533
k7_8	CACCAGAGCNTCTTTG-GTGANCAAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGAAGNGTG	590
k1_2_3	TACTAGAGCTTCATTGAGGGCA-AAAGATAAGAAGGAAAAGACGAAGATGAATGCCGGTG-	590
k4_5_6	TACTAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGA-GA--AGTGTGT-GT	583
rho1.komplet	TACTAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGA--AATGTGTTGT	590
k1_2_3	CTTG	594
k4_5_6	CTTGTAATG	593
rho1.komplet	CTTGTA	597

k1_2_3 = Konsensussequenz von *C. parapsilosis* ATCC 90018; k4_5_6 = Konsensussequenz von *C. tropicalis* ATCC 201381; k7_8 = Konsensussequenz von *C. lusitaniae* DSM 70102; rho1.komplet = RHO 1-Sequenz von *C. albicans* (Genbank Nummer: D86430)

Abb. 3-28: Konsensussequenzen von *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. tropicalis* ATCC 201381, *C. lusitaniae* DSM 70102 im Vergleich zur RHO1-Sequenz von *C. albicans*

Die Konsensussequenzen wurden anschließend mit der publizierten RHO1-Sequenz von *C. albicans* [109] verglichen und die bekannten Primersequenzen am Anfang und Ende der Konsensussequenzen manuell eingefügt (s. 2.2.7; S.39). Das Ergebnis zeigt die folgende Abb. 3-29 (S.77).

k4_5_6aoligo	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAAATTAGTCAT-YGTCGGTGATGGTGCTTG	60
rho1.komplet	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAAATTAGTCAT-TGTCGGTGATGGTGCTTG	59
k1_2_3aoligo	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAAATTAGTCAT-TGTTGGTGATGGTGCTTG	59
k7_8aoligo	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAGTTGGTCATCTGTCCGGTGACGGTGCTTG	60
k4_5_6aoligo	TGGTAAAACCTTGTGTTGATTGTTTTCTCAAAGGTAAGTTCCAGAAAGTTTACGTCCC	120
rho1.komplet	TGGTAAAGACTTGTGTTTATTAATTGTTTTCTCAAAGGTAAGTTCCAGAAAGTTTATGTCCC	119
k1_2_3aoligo	TGGTAAAGACTTGTGTTTATTAATTGTTTTCTCAAAGGTACATTTCCAGAGGTATATGTTC	119
k7_8aoligo	TGGTAAAGACTTGTCTTTTGTGATTGTTTTCTCAAAGGCACTTTCCAGAAAGTYTATGTTC	120
k4_5_6aoligo	AACAGTTTTTGAAAAATTACGTTGCTGATGTCGAAGTCGATGGTAGAAAAAGTTGAATTGGC	180
rho1.komplet	AACAGTTTTTGAAAAATTACGTTGCTGATGTTGAAGTTGATGGTAGAAAAAGTTGAATTGGC	179
k1_2_3aoligo	CACAGTTTTTGAAAAATTATGTTGCTGATGTTGAAGTTGATGGAAGAAAAAGTTGAGTTGGC	179
k7_8aoligo	AACCGTTTTTCGAGAATTACGTTGCTGATGTCGAGGTCGATGGCAGAAAAAGTCGAATTGGC	180
k4_5_6aoligo	CTTATGGGATACCGCGGTCAAGAAGATTACGATAGATTAAGACCTTTGTCATATCCAGA	240
rho1.komplet	ATTATGGGATACTGCTGGTCAAGAAGATTATGATAGATTAAGACCATTTATCTTATCCAGA	239
k1_2_3aoligo	ACTTTGGGATACTGCCGGTCAAGAAGATTACGATAGATTAAGACCATTTATCATACCAGA	239
k7_8aoligo	CCTTTGGGATACTGCCGGTCAAGAAGATTACGACAGATTGAGACCTTTGTCTTACCAGA	240
k4_5_6aoligo	TTCCAATGTCATTTTGTGATTGTTTTCTCAGTCGATTCACCAGATTCATTAGATAACGTCCT	300
rho1.komplet	TTCTAATGTTATTTTGTGATTGTTTTCTCAGTTGATTCACCAGATTCATTAGATAACGTCCT	299
k1_2_3aoligo	TTCCAATGTCATTTTGTGATTGTTTTCTCAGTTGATTCACCCGATTCATTGGATAATGTTT	299
k7_8aoligo	CTCCAATGTTATTTTGTGATTGTTTTCTATTGACTCGCCAGACTCTTTGGACAATGTTT	300
k4_5_6aoligo	AGAAAAATGGATTTCTGAAGTTTTACATTTCTGTCAAGGTGTCCCAATCATTTTGGTTGG	360
rho1.komplet	AGAAAAATGGATTTCTGAAGTTTTACATTTCTGTCAAGGTGTCCCAATCATTTTAGTTGG	359
k1_2_3aoligo	GGAAAAATGGATCTCAGAAGTTTTGCATTTCTGTCAAGGTGTCCCAATCATTTTGGTTGG	359
k7_8aoligo	GGAGAAGTGGATTTCTGAGGTGTGCACCTTCTGCCAAGGCGTTCCTATCATCTTGGTTGG	360
k4_5_6aoligo	TTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCACACACTATTGAAGCCTTGAGAC-AACAACAA	420
rho1.komplet	TTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCCTCATACTATTGAAGCCTTGAGAC-AACAACAA	417
k1_2_3aoligo	TTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCCCATACCATTGAAGCCTTGAGAC-AACATCAA	417
k7_8aoligo	CTGTAAAGTCAGACTTGAGWAACGAHHCAGCCACCATTCAAGGCTTTGGTCCAAGAAAAAC	420
k4_5_6aoligo	CAACAACCAGTCTCTTCTTCTGAAGGTCAAGAAGTTGCTCAAAGAATCGGAGCTGCTG-A	480
rho1.komplet	CAACAACCAGTCTCAACTTCTGAAGGTCAACAAGTTGCTCAAAGAATGGTGCTGCTG-A	476
k1_2_3aoligo	CAACARCCAGTTTCAACTTCTGAAGGACAGGCTGTTGCTCAAAGAATGGTGCTGCTG-A	476
k7_8aoligo	CAGCAACCTGTCTCTTCTTCCGAAGGTGAGGCTGTTGCTCAGAAGATTGGTACC-CAGTA	479
k4_5_6aoligo	TTACTTGGAAATGTTCTGCTAAAACCTGGTAGAGGTGTTAGAGAAGTTTTCGAAGCTGCTAC	540
rho1.komplet	TTACTTGGAAATGTTCTGCTAAAACCGGTAGAGGTGTTAGAGAAGTTTTCGAAGCTGCTAC	536
k1_2_3aoligo	TTATTTGGAAATGTTCCGCCAAGACTGGAAGAGGAGTTAGAGAAGTTTTCGAAGCTGCTAC	536
k7_8aoligo	TTACTTGGAGTGTCTGCTAGAACCGGCCAAGGTGTCAGAGAAGTTTTCGAAGCTGCTAC	539
k4_5_6aoligo	TAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGA--AGTGTGTGCTCTT	600
rho1.komplet	TAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGA--AATGTGTGCTCTT	593
k1_2_3aoligo	TAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGATAAGAAGGAAAAGAAGAAGA--AATGTGTGCTCTT	593
k7_8aoligo	CAGAGCWTCTTTG-GTGASCAAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGA--AGTGTGTGCTCTT	595
k4_5_6aoligo	GTAA	660
rho1.komplet	GTAA	597
k1_2_3aoligo	GTAA	599
k7_8aoligo	GTAA	600

k1_2_3aoligo = bearbeitete Konsensussequenz von *C. parapsilosis* ATCC 90018; k4_5_6aoligo = bearbeitete Konsensussequenz von *C. tropicalis* ATCC 201381; k7_8aoligo = bearbeitete Konsensussequenz von *C. lusitaniae* DSM 70102; rho1.komplet = RHO 1-Sequenz von *C. albicans* (Genbank Nummer: D86430)

Abb. 3-29: bearbeitete Konsensussequenzen von *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. tropicalis* ATCC 201381, *C. lusitaniae* DSM 70102 im Vergleich zur RHO1-Sequenz von *C. albicans*

Tab. 3-7: Veränderungen in der As-Sequenz bei *C.parapsilosis* ATCC 90018

Position in As-Sequenz	Aminosäureaustausch	Triplett
138	H (Histidin) für Q (Glutamin)	CAT für CAA
150	A (Alanin) für Q (Glutamin)	GCT für CAA
185	A (Alanin) für V (Valin)	GCA für GTT
187	D (Asparagin) für E (Glutamin)	GAT für GAA
192	X (unknown) für K (Lysin)	AMG für AAG
194	X (unknown) für K (Lysin)	AKD für AAG
195-199	NVLS als Einschub	

Aus der Betrachtung dieser Bereiche in der Nukleotidsequenz beider Stämme erscheint es wahrscheinlich, dass es sich bei den Unterschieden in der Aminosäuresequenz an den Positionen 138, 150, 185, 187 und 192 um eindeutige Abweichungen handelt.

Der auffällige Unterschied am Ende der Aminosäuresequenz ab Position 194 war ungewöhnlich, da dieser Bereich größtenteils der Sequenz des 3'-5' Primers entsprach und damit keine Abweichungen auftreten dürften. Die intensive Analyse dieses entsprechenden Bereiches in der Nukleotidsequenz führte zu folgenden Erkenntnissen:

An den Positionen 581/582 der Nukleotidsequenz des Stammes *C. parapsilosis* ATCC 90018 gibt es einen Einschub der Nukleotide „TD“ im Vergleich zur RHO1-Sequenz von *C. albicans* bzw. zu den Stämmen *C. lusitaniae* DSM 70102 und *C. tropicalis* ATCC 201381, wie der folgende Ausschnitt aus den jeweiligen Nukleotidsequenzen verdeutlichen soll.

<i>C. tropicalis</i>	TAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGAA--AGTGTGTTGTCTT	593
Rho1(<i>C. alb.</i>)	TAGAGCTTCTTTAAGAGTT-AAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGAA--AATGTGTTGTCTT	593
<i>C. paraps.</i>	TAGAGCTTCATTGAGGGCA-AAAGATAAGAAGGAAAAGAHGAAGA TD AATGTGTTGTCTT	595
<i>C. lusitaniae</i>	CAGAGCWTCTTTG-GTGASCAAAGAAAAGAAGGAAAAGAAGAAGAA--AGTGTGTTGTCTT	596
<i>C. tropicalis</i>	GTAA	597
Rho1(<i>C. alb.</i>)	GTAA	597
<i>C. paraps.</i>	GTAA	599
<i>C. lusitaniae</i>	GTAA	600

Infolge dieses Einschubs verschiebt sich das Leseraster, da definitionsgemäß drei aufeinanderfolgende Nukleotide, das sogenannte Nukleotidtriplett oder Codon, für die

Codierung einer Aminosäure verantwortlich ist. Die Konsequenz ist daher die Änderung in der Aminosäuresequenz, wie der nachfolgende Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz zeigt:

```
Rho1 (C. alb.) ASLRVKEKKEKKKK----CVVL*      199
C. paraps.   ASLRAKDKKEKXXKNVLSC          199.
```

Was würde also theoretisch passieren, wenn man diese beiden Nukleotide entfernt?

Wie in dem folgenden Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz deutlich wird, führt die Entfernung der Nukleotide zur „erwarteten Aminosäuresequenz“:

```
Rho1 (C. alb.) ASLRVKEKKEKKKKCVVL*          199
C. paraps.   ASLRAKDKKEKXXKCVVL*          199.
```

Eine ausführliche Auseinandersetzung über die möglichen Ursachen dieser Abweichung erfolgt in der Diskussion. Zusammenfassend lässt sich aber feststellen, dass zwischen der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons von *C. parapsilosis* ATCC 90018 und der Aminosäuresequenz des RHO1-Gens von *C. albicans* eine Übereinstimmung von über 90% besteht und es sich damit um ein RHO1-ähnliches Sequenzmuster handelt.

Unproblematisch gestaltete sich der Vergleich der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons des Stammes *C. tropicalis* ATCC 201381 mit der RHO1-Sequenz von *C. albicans*. Der Vergleich der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz zeigte nur zwei Abweichungen, wie in der nachfolgenden Tab. 3-8 (S.80) schematisch dargestellt wird.

Tab. 3-8: Veränderungen in der As-Sequenz bei *C. tropicalis* ATCC 201381

Position in As-Sequenz	Aminosäureaustausch	Triplet
145	S (Serin) für T (Threonin)	TCT für ACT
150	E (Glutamic) für Q (Glutamin)	GAA für CAA

Wie die nachfolgende Darstellung der Aminosäuresequenzen beider Spezies zeigt, besteht ansonsten eine völlige Übereinstimmung.

```
Rho1 (C. a.) MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKGTFFPEVYVPTVVFENYVADVEVDGRKVELA 60
C. trop.   MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKGTFFPEVYVPTVVFENYVADVEVDGRKVELA 60
```

Rho1 (<i>C. a.</i>)	LWDTAGQEDYDRLRPLSYPDENVILICFSVDSPDSDLNVLEKWISEVLHFCQGVPIILVG	120
<i>C. trop.</i>	LWDTAGQEDYDRLRPLSYPDENVILICFSVDSPDSDLNVLEKWISEVLHFCQGVPIILVG	120
Rho1 (<i>C. a.</i>)	CKSDLRDDPHTIEALRQQQQQPVS T SEGQ Q VAQRIGAADYLECSAKTGRGVREVFEEATR	180
<i>C. trop.</i>	CKSDLRDDPHTIEALRQQQQQPVS S SEGQ E VAQRIGAADYLECSAKTGRGVREVFEEATR	180
Rho1 (<i>C. a.</i>)	ASLRVKEKKEKKEK---CVVL*	199
<i>C. trop.</i>	ASLRVKEKKEKKEK---CVVL*	199

Aus diesem Grund ist mit großer Sicherheit davon auszugehen, dass es sich bei dem RHO1-ähnlichen Amplikon des Stammes *C. tropicalis* ATCC 201381 um ein Homolog des RHO1-Gens von *C. albicans* handelt.

Am schwierigsten gestaltete sich der Vergleich der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 mit der RHO1-Sequenz von *C. albicans*. Dabei zeigten sich deutliche Abweichungen, sowohl bedingt durch Nukleotideinschübe bzw. fehlende Nukleotide, als auch durch eindeutige Nukleotidabweichungen. Besonders auffällig waren dabei zwei Bereiche: der erste ab Position 15 und der zweite ab Position 119 der Aminosäuresequenz. Diese in der folgenden Darstellung farbig hervorgehobenen Bereiche ließen einen Einschub bzw. eine Deletion eines Nukleotids vermuten, welche zur Verschiebung des Leserasters und damit zur Veränderung in der Aminosäuresequenz führt.

	: . : . : . : . : . :	60
<i>C. lusitaniae</i>	MVNGPAELRRKLV -----CR*RCLW*DLS FDCFLQGHFPRSLCSNRFR-----ELRC*	49
Rho1 (<i>C. a.</i>)	MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCL-----LIVFSKGTFFPEVYVPTVFENYVADVEV---	52
	. : . : . : . : . : . :	120
<i>C. lusitaniae</i>	CRGR-----WQKS-----RIGPLGYCGSGRLRQIETFVLPRLQCYFDLFXFYLARLFG	97
Rho1 (<i>C. a.</i>)	-DGRKVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDENVI--LICFSVDSPDSDLNVLEKWISEVLH	109
	. : . : . : . : . : . :	180
<i>C. lusitaniae</i>	QCFGEVDF*GVALLPRRSYHL GWL*SQT*XTXQPPFKALVQEN QQPVSSSEGEAVAQKIG	157
Rho1 (<i>C. a.</i>)	FCQGV----PIILVGCKS-DL-----RDDPHTIEALRQQQQQPVSTSEGQQVAQRIG	156
	. : . : . : . : . : . :	240
<i>C. lusitaniae</i>	TQYYLECSARTGGVREVFETATRASLVXKEKKEKKEK---CVVL*	200
Rho1 (<i>C. a.</i>)	AADYLECSAKTGRGVREVFEEATRSLRVKEKKEKKEK---CVVL*	199

Als mögliche Ursachen für diese Veränderungen kommen einerseits ein Frame-Shift am Anfang der Sequenz, andererseits auch eine Chimärenbildung bei der PCR in Frage.

Es erfolgte, unter Berücksichtigung dieser Überlegungen, eine gezielte Betrachtung beider Aminosäuresequenzen. Zunächst wurden mit Hilfe des HUSAR (Funktion MAP) die drei möglichen Leseraster (frames) der Sequenz des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 miteinander verglichen. Dabei war erkennbar, dass sich das Leseraster ab der 15. Aminosäure von frame 1 in frame 2 verschiebt. Der Vergleich mit der RHO1-Sequenz von *C. albicans* zeigt bis zur 14. Aminosäure im ersten Leseraster, und von der 15. bis zur 122. Aminosäure im zweiten Leseraster eine Übereinstimmung. Betrachtet man die Sequenz ab der Position 122 weiter, fällt auf, dass im dritten Leseraster vier Aminosäuren (...KSDL) identisch sind mit RHO1 (*C. albicans*) und nach fünf abweichenden Aminosäuren wieder zwei übereinstimmende Aminosäuren folgen. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass ein Nukleotideinschub sowohl am Anfang der Sequenz, als auch an Position 122 zu den Verschiebungen im Leseraster und damit zur Veränderung in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu RHO1 geführt hat.

Daraufhin wurde die Nukleotidsequenz des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 insbesondere in diesen Bereichen näher betrachtet und an der Position 42 das Nukleotid „C“ entfernt. Infolgedessen kommt es zur Verschiebung des Leserasters, so dass nun die Aminosäuresequenz, gelesen mit frame 1, von Position 1-122 mit Ausnahme der Position 90 mit der Sequenz von RHO1 (*C. albicans*) identisch ist, es aber ab Position 123 zur völligen Abweichung kommt. Die Darstellung des nun identischen Bereiches zeigt farbig hervorgehoben die nachfolgende Abbildung, wobei die veränderte Sequenz des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 mit dem Zusatz b versehen wurde.

<i>C. lusitaniae</i>	MVNGPAELRRKLV-----CR*RCLW*DLSFDCFLQGHFPRSLCSNRFR-----ELRC*	49
Rho1(<i>C. a.</i>)	MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCL-----LIVFSKGTTFPEVYVPTVFENYVADVEV---	52
<i>C. lusit./b</i>	MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCL-----LIVFSKGTTFPEVYVPTVFENYVADVEV---	52
<i>C. lusitaniae</i>	CRGR-----WQKS-----RIGPLGYCGSGRLRQIETFVLPRLQCYFDLFX*Y*LARLFG	97
Rho1(<i>C. a.</i>)	-DGRKVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDSNVI--LICFSVDSPPDSDLDNVLEKWISEVLH	109
<i>C. lusit./b</i>	-DGRKVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDSNVI--LICFSIDSPDSDLDNVLEKWISEVLH	109
<i>C. lusitaniae</i>	QCFGEVDF*GVALLPRRSYHLGWL*SQT*XTXQPPFKALVQENQQPVSS-SEGEAVAQKI	156
Rho1(<i>C. a.</i>)	FCQGV----PIILVGCKS-DL-----RDDPHTIEALRQQQQPVST-SEGQQVAQRI	155
<i>C. lusit./b</i>	FCQGV----PIILVGCKV-RL-----EXRXSHHSRLWSKKTSNLSLLPKVRLLLRRL	156

<i>C. lusitaniae</i>	GTQ----YYLECSARTGQGVREVFETATRASLVXKEKKEKXXXXX----VVL*	200
Rho1 (<i>C. a.</i>)	GAAD----YLECSAKTGRGVREVFEEAATRASLRVKEKKEKXXXXX----CVVL*	199
<i>C. lusit.</i> /b	VPSITWSVLLLEPAKVSEKCLK-----LPPEXLW*XKKRRRKRSSVLS	199

Vergleicht man den Bereich der Nukleotidsequenz, in dem die Deletion des Nukleotids erfolgte, mit den Nukleotidsequenzen von RHO1 (*C. albicans*), *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 ist zu erkennen, dass es sich bei dem manuell entfernten Nukleotid „C“ um einen Nukleotideinschub handelt, wie der nachfolgende Ausschnitt aus den Nukleotidsequenzen veranschaulicht.

<i>C. tropicalis</i>	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAATTAGTCAT-YGTCGGTGATGGTGCTTG	59
Rho1 (<i>C. a.</i>)	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAATTAGTCAT-TGTCGGTGATGGTGCTTG	59
<i>C. paraps.</i>	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAATTAGTCAT-TGTTGGTGATGGTGCTTG	59
<i>C. lusitaniae</i>	ATGGTTAACGGTCCAGCTGAACTTCGTAGAAAAGTTGGTCATCTGTCGGTGACGGTGCTTG	60

Aufgrund dieser Erkenntnis wurden sowohl die Konsensussequenz, als auch die reverse und forward Sequenz sowie die Chromatogramme des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 in diesem Bereich erneut begutachtet. Retrospektiv ließ sich feststellen, dass dieses Nukleotid „C“ in den Chromatogrammen sowohl der reversen, als auch der forward Sequenz nicht eindeutig zu erkennen ist und damit fälschlicherweise bei der Bildung der Konsensussequenz berücksichtigt wurde.

Wie bereits erwähnt, gab es einen weiteren auffälligen Abschnitt innerhalb der Aminosäuresequenz, welcher etwa im Bereich der 122.–133. Aminosäure gelegen war. Es wurde untersucht, ob der Einschub eines Nukleotids an Position 355 der Nukleotidsequenz (entspricht etwa Position 120 der Aminosäuresequenz) zur einer höheren Übereinstimmung der nachfolgenden Aminosäuren führt. Es konnte dadurch aber keine größere Kongruenz der Aminosäuresequenz zwischen *C. lusitaniae* DSM 70102 und RHO1 (*C. albicans*) festgestellt werden.

Es wurden zwei weitere Veränderungen innerhalb der Nukleotidsequenz vorgenommen. Zunächst wurde an Position 367 das Nukleotid „G“ entfernt, wodurch sich die Aminosäurefolge ab Position 123 so veränderte, dass die drei folgenden Aminosäuren (...PIILVGCK**SDL**) mit RHO1 (*C. albicans*) übereinstimmen. Auf diese Aminosäuren folgt ein „schwer lesbarer“ Bereich von fünf Aminosäuren, auf den wiederum zwei mit RHO1 übereinstimmende Aminosäuren folgen (XNXXAT**I**...). Vergleicht man erneut den Bereich

innerhalb der Nukleotidsequenz, in dem die Deletion erfolgte, mit den Nukleotidsequenzen von RHO1 (*C. albicans*), *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 ist zu erkennen, dass es sich bei dem entfernten Nukleotid „G“ ebenfalls um einen Nukleotideinschub handelt, wie der nachfolgende Ausschnitt aus den Nukleotidsequenzen veranschaulicht.

<i>C. tropicalis</i>	TTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCACACACTATTGAAGCCTTGAGAC-AACAACAA	417
Rho1(<i>C.a.</i>)	TTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCTCATACTATTGAAGCCTTGAGAC-AACAACAA	417
<i>C. paraps.</i>	TTGTAAA-TCTGATTTAAGAGATGATCCCCATAACCATTGAAGCCTTGAGAC-AACATCAA	417
<i>C. lusitaniae</i>	CTGTAAA G TCAGACTTGAGWAACGAHHCAGCCACCATTCAAGGCTTTGGTCCAAGAAAAC	420

Allerdings ist dieses Nukleotid in den Chromatogrammen der forward und reversen Sequenz als deutlicher Peak erkennbar. Da aber im Anschluß an diese Position ein „schlecht lesbarer“ Bereich folgt, welcher in der Aminosäuresequenz dreimal ein X (für unknown) enthält, kann man davon ausgehen, dass die Entfernung eines Nukleotids in diesem Bereich das gleiche Ergebnis zur Folge hätte.

Als zweite Änderung wurde an Position 397 der Nukleotidsequenz (entspricht etwa Position 133 der Aminosäuresequenz) das Nukleotid „C“ entfernt, wodurch sich das Leseraster so verschiebt, dass in der nachfolgenden Aminosäurefolge eine hohe Kongruenz mit RHO1 besteht. Auch für dieses Nukleotid konnte daraufhin retrospektiv festgestellt werden, dass es in den Chromatogrammen der forward und der reversen Sequenz nicht eindeutig zu erkennen ist und damit fälschlicherweise bei der Bildung der Konsensussequenz berücksichtigt wurde.

Die nach den genannten Änderungen resultierende Sequenz des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 zeigt im direkten Vergleich mit der Sequenz von RHO1 (*C. albicans*) nun folgendes Bild:

Rho1(<i>C.a.</i>)	MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKGTFFPEVYVPTVVFENYVADVEVDGRKVELA	60
<i>C. lusitaniae</i>	MVNGPAELRRKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKGTFFPEVYVPTVVFENYVADVEVDGRKVELA	60
Rho1(<i>C.a.</i>)	LWDTAGQEDYDRLRPLSYPDENVILICFSVDSPLDNVLEKWISEVLHFCQGVPIILVG	120
<i>C. lusitaniae</i>	LWDTAGQEDYDRLRPLSYPDENVILICFSIDSPDSPLDNVLEKWISEVLHFCQGVPIILVG	120

Rho1(<i>C.a.</i>)	CKSDLRDDPHTIEALRQQQQPVSTSEGQQVAQRIGAADYLECSAKTGRGVREVFEEATR	180
<i>C.lusitaniae</i>	CKSDLXNXXATIKALVQENQQPVSSSEGEAVAQKIGTQYYLECSARTGQGVREVFETATR	180
Rho1(<i>C.a.</i>)	ASLRVKEKKEKKEKCVVL*	199
<i>C.lusitaniae</i>	ASLVXKEKKEKKEKCVVL*	199

Zur Veranschaulichung wurden die nun mit RHO1 identischen Sequenzbereiche farbig hervorgehoben. Aufgrund einer prozentualen Übereinstimmung von 88,9% zwischen beiden Sequenzen kann man sagen, dass es sich auch bei dem RHO1-ähnlichen Amplikon des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 um ein zu *C. albicans* RHO1-ähnliches Sequenzmuster handelt.

Im abschließenden Vergleich der Sequenzen der Stämme

- *Candida lusitaniae* DSM 70102,
- *Candida parapsilosis* ATCC 90018 und
- *Candida tropicalis* ATCC 201381

nach den dargestellten Bearbeitungen mit der publizierten RHO1-Sequenz von *C. albicans* [109] ist zu erkennen, dass sich die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen bei Betrachtung des gesamten Gens besonders auf einen Abschnitt des Gens konzentrieren.

Im Bereich zwischen der Position 138 bis 150 häufen sich die Abweichungen, wenn man die o.g. drei Stämme im Komplex mit RHO1 vergleicht. In der folgenden Darstellung wird dieser offensichtlich variable Bereich innerhalb des RHO1-Gens schematisch dargestellt.

<i>C.lusitaniae</i>	CKSDLXNXXATIKALVQENQQPVSS-SEGEAVAQKIGTQY----YLECSARTGQGVREVF	175
<i>C.paraps.</i>	CKSDLRDDPHTIEALRQHQQQPVST-SEGQAVAQKIGAAD----YLECSAKTGRGVREVF	175
<i>C.tropicalis</i>	CKSDLRDDPHTIEALRQQQQPVSS-SEGQEVAQRIGAAD----YLECSAKTGRGVREVF	175
Rho1(<i>C.a.</i>)	CKSDLRDDPHTIEALRQQQQPVST-SEGQQVAQRIGAAD----YLECSAKTGRGVREVF	175

Die folgende Tab. 3-9 (S.86) zeigt, dass die Ursache für die Änderung der jeweiligen Aminosäure in der Regel der Austausch eines Nukleotids ist.

Tab. 3-9: Veränderungen der As-Sequenz infolge Nukleotidaustausch

Spezies	As-Position	Aminosäure	Triplett
<i>C.albicans</i> (RHO 1)	138	Q (Glutamin)	CAA
<i>C.tropicalis</i>	138	Q (Glutamin)	CAA
<i>C.parapsilosis</i>	138	H (Histidin)	CAT
<i>C.lusitaniae</i>	138	E (Glutamic)	GAA
<i>C.albicans</i> (RHO 1)	145	T (Threonin)	ACT
<i>C.tropicalis</i>	145	S (Serin)	TCT
<i>C.parapsilosis</i>	145	T (Threonin)	ACT
<i>C.lusitaniae</i>	145	S (Serin)	TCT
<i>C.albicans</i> (RHO 1)	150	Q (Glutamin)	CAA
<i>C.tropicalis</i>	150	E (Glutamic)	GAA
<i>C.parapsilosis</i>	150	A (Alanin)	GCT
<i>C.lusitaniae</i>	150	A (Alanin)	GCT

Interessanterweise lag die Schnittstelle des Restriktionsenzymys BseNI, mit dem die 29 verschiedenen *C. albicans* Stämme geschnitten wurden, in diesem variablen Bereich. Das Enzym schneidet an Position 424 der Nukleotidsequenz. Dabei waren anhand der Schnittmuster keine Unterschiede zu erkennen, so dass es möglich wäre, dass Veränderungen in diesem Bereich keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins haben.

Zusammenfassend lassen sich nun die am Anfang des Kapitels formulierten Fragen wie folgt beantworten:

1. Die Ergebnisse der Sequenzierung der RHO1-ähnlichen Amplikons der Stämme *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 konnten den Beweis erbringen, dass es sich bei dem *C. tropicalis* Stamm sehr wahrscheinlich um ein Homolog des RHO1-Gens von *C. albicans* handelt. Die zwei anderen Stämme zeigen ebenfalls ein dem RHO1-Gen von *C. albicans* ähnliches Sequenzmuster, wobei die Unterschiede in der Aminosäuresequenz überwiegend durch Nukleotideinschübe oder fehlende Nukleotide zu erklären sind.
2. Die Abweichungen konzentrieren sich insbesondere im hinteren Abschnitt der Aminosäuresequenzen zwischen der Position 138–150, wobei im Vergleich der Schnittmuster der drei Stämme mit dem Restriktionsenzymys BseNI, dessen Schnittstelle in diesem Bereich liegt, keine Unterschiede zu verzeichnen waren.

-
3. Mit Hilfe der Sequenzanalyse war eine Erklärung der unterschiedlichen Schnittmuster bei den verschiedenen *Candida* Spezies nach Restriktion des RHO1-ähnlichen Amplikons mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen möglich. Eine genaue Erläuterung und Diskussion dieser Frage erfolgt im abschließenden Kapitel der Dissertationsschrift.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Quantifizierung der Pilzzellen einer Übernachtkultur

Hinsichtlich der experimentellen Arbeiten war eine geeignete Methode zur Quantifizierung der Pilzzellen zu finden. Dafür bot sich aufgrund der Genauigkeit und Einfachheit die Bestimmung der Keimzahl über die Optische Dichte (OD) an. Die Optische Dichte reflektiert die Anzahl der Pilzzellen (Teilchen) pro Volumen und lässt sich als Trübung mit dem Photometer bestimmen (siehe 2.2.3.2; S.31). Dazu war die Annahme zu überprüfen, dass bei *Candida*-Pilzen eine optische Dichte von 1,0 einer Konzentration von 5×10^7 Pilzzellen/ml entspricht und dass zwischen der Pilzkonzentration und der OD Proportionalität besteht. Die experimentellen Ergebnisse konnten dies bestätigen. Im Vergleich der mit Hilfe verschiedener Methoden berechneten Keimzahl traten nur geringe Abweichungen mit einem Faktor von 0,5–2 auf (siehe 3.2.3; S.44). Aufgrund des günstigen technischen und zeitlichen Aufwandes im Vergleich zu anderen Methoden wie Auszählen der Pilzzellen mittels Neubauer-Zählkammer oder CFU-Bestimmung wurde deshalb für die weiteren Experimente die OD-Methode verwendet. Die Quantifizierung der Pilzzellen einer Übernachtkultur war ein wichtiger Bestandteil der Methodik, um die späteren Versuchsergebnisse miteinander vergleichen zu können.

4.1.2 DNA-Präparationsmethoden

Für den Nachweis des RHO1-Gens war es erforderlich, eine geeignete Methode zur Extraktion der Pilz-DNA herauszufinden und diese zu optimieren. Darüber hinaus galt es zu überprüfen, bei welcher der in der PCR eingesetzten DNA-Konzentration die Amplifizierung des RHO1-Gens noch möglich war bzw. bei welcher DNA-Konzentration man in der Gelelektrophorese eine aussagekräftige Bande erhält (s.3.2.4; S.45). Es erfolgte ein Vergleich zwischen der DNA-Präparation ohne Reinigung der DNA und der „klassischen“ Extraktion mit nachfolgender Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation. Anfänglich konnten mit beiden Methoden keine zufriedenstellenden Ergebnisse, d.h. nach Durchführung der PCR zur Amplifizierung des RHO1-Gens in der Gelelektrophorese keine aussagekräftigen Banden, erzielt werden. Folgende Ursachen für diese negativen Ergebnisse wurden in die Überlegungen einbezogen:

1. Unzureichender Zellaufschluß. Eine Möglichkeit diesen Aufschluss zu verbessern, besteht in der Zugabe von Tween 20, da durch dieses nichtionische Detergens die Zellyse der Pilze verbessert werden kann.
2. Inhibition der PCR durch die DNA-Präparation. Um diese Annahme zu überprüfen, müsste man ein Plasmid, d.h. ein extrachromosomales, ringförmiges selbstreplizierendes DNA-Molekül aus Bakterien, sowie für die Amplifizierung des Plasmids geeignete Primer, zur Matrizen-DNA dazugeben. Dies war aber nicht Gegenstand der Arbeit und wurde auch nicht durchgeführt.
3. Die Qualität der DNA war zu gering und die Verluste während der DNA-Extraktion zu hoch, d.h. es müsste zur Präparation eine höhere Zellzahl eingesetzt werden.

In den nachfolgenden Experimenten wurden deshalb die im Kapitel 3.2.4 (s.S.45) dargestellten Veränderungen vorgenommen. Die in der Abbildung Abb. 3-4 (s.S.47) dargestellten Ergebnisse beweisen, dass die „klassische“ DNA-Präparationsmethode der DNA-Extraktionsmethode ohne Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation deutlich überlegen ist. Auch die Nachweisgrenze von 100 Pilzen pro PCR-Ansatz bedeutet im Vergleich zu anderen Methoden eine hohe Wirksamkeit der genutzten Präparationsmethode. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den weiteren Versuchen generell die „klassische“ DNA-Präparation mit Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation eingesetzt.

Die durchgeführten und im Kapitel 3.2.4 (s.S.45) dargestellten Experimente führten zu dem Ergebnis, dass die Nachweisgrenze der PCR, bei der in der Gelelektrophorese noch eine Bande erkennbar ist, unter den dargestellten Bedingungen, bei $0,61 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ Pilz-DNA liegt. Damit lässt sich unter Berücksichtigung, dass 100 Pilze pro PCR-Ansatz in der Elektrophorese noch als Bande erkennbar sind, feststellen: 100 Pilze pro PCR-Reaktionsvolumen enthalten mindestens $0,61 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ DNA oder anders ausgedrückt: unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes für Hefezellen kann man schlussfolgern, dass die Nachweisgrenze der PCR bei der in der Gelelektrophorese noch eine Bande zu erkennen ist, für die eingesetzte Methode bei 35 Genomen liegt.

Loeffler et al. präsentierten in Ihrer Publikation [132] eine andere schnelle und zuverlässige Methode zur DNA-Extraktion von Hefepilzen und nachfolgender Amplifikation der DNA mit der PCR. Mit dieser Methode erreichten sie eine Sensitivität von mindestens 101 CFU, 100 fg der Pilz-DNA entsprechend, für alle Spezies-typischen Proben und die allgemeine *Candida*-Probe. Auch Einsele et al. [50] erreichten mit ihrer DNA-Extraktionsmethode, welche nur wenige Unterschiede zur Arbeitsgruppe von Loeffler zeigte, in der nachfolgenden

Amplifikation und Agarosegelelektrophorese eine Sensitivität von 100 fg der Pilz-DNA, 6 *C. albicans* Genomen entsprechend, welche sich durch anschließende Southern blot Hybridisierung noch auf 10 fg, 1 Genom entsprechend, verbessern ließ [50; 134]. Die Sensitivität dieser DNA-Extraktionsmethoden wäre somit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode überlegen. Lugert et al. [134] verglichen in Ihrer Studie sechs verschiedene DNA-Präparationsmethoden und verschiedene nachfolgende PCR-Techniken, u.a. in Anlehnung an die Methode von Einsele et al. [50]. Eine thermisch-enzymatische Präparation unter Verwendung des Enzyms Zymolase, welche zuvor auf Kontamination zu testen ist, scheint demnach für die Detektion von Pilz-DNA am besten geeignet zu sein [134]. Eine Nachweisgrenze der PCR von $0,61 \times 10^{-6}$ µg DNA, 35 Genomen entsprechend, war allerdings für die Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit völlig ausreichend.

4.1.3 Amplifizierung des RHO1-Gens mittels PCR

Wesentlich für die Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit war die Optimierung der PCR zur Amplifizierung des RHO1-Gens bei *Candida*-Spezies. Diese, von Saiki und Mullis [195; 196] entwickelte Methode zur Amplifizierung von DNA, war auch für den Nachweis des RHO1-Gens bei anderen Pilzen, wie *Cryptococcus neoformans* [221] und *Mucor rouxii* [7], sowie bei Parasiten wie *Schistosoma mansoni* [231] und *Trypanosoma cruzi* [161] verwendet worden.

Zunächst mussten passende Oligonukleotid-Primer kreiert werden, die den gewünschten Genabschnitt einrahmen. Die von Kondoh et al. [109] publizierte RHO1-Sequenz bei *C. albicans* wurde dafür als Vorlage genutzt und unter Berücksichtigung weiterer Kriterien (s. Kapitel 3.1; S.40) das Primerpaar $\frac{1}{2}$ (s.Tab. 2-5; S.27) kreiert. Damit war eine erfolgreiche spezifische Amplifizierung der RHO1-Gens bei *C. albicans* mit einer Bandengröße von 600 bp in der Gelelektrophorese, die der erwarteten Amplikongröße von 597 bp entsprach, möglich (s.Abb. 3-1; S.42). Dies war wichtig, da Primer, die auch an unspezifische Abschnitte der Matrize binden, sowohl die Ausbeute des Amplikons verringern, als auch die Bildung von Artefakten begünstigen [162].

Für die Spezifität der PCR-Reaktion ist darüber hinaus eine geeignete Polymerase erforderlich, welche unter bestimmten Reaktionsbedingungen die Primer entlang der Matrize verlängern kann. Die Synthese des neuen Stranges erfolgt immer von 5' in 3' Richtung. Die Taq-DNA-Polymerase zählt zu den hochprozessiven Polymerasen, d.h. es wird eine hohe Anzahl an Nukleotiden repliziert bevor sie von der Matrize abfällt. Sie besitzt eine 5'→3'-Exonucleaseaktivität, wodurch Nukleotide vor der Polymerase abgebaut werden können.

Aufgrund der dieser Polymerase fehlenden 3'→5'-Exonucleaseaktivität können DNA-Synthesefehler durch falsch eingebaute oder gepaarte Nukleotide nicht repariert werden. Das ist ein Nachteil gegenüber Polymerasen mit 3'→5'-Exonucleaseaktivität (z.B. Pwo-Polymerase), weil die Präzision der DNA-Synthese dadurch geringer ist. Ein Nachteil der 3'→5'-Exonucleaseaktivität ist dagegen die Fähigkeit zum Abbau von Primern und Matrize. Für Polymerasen mit dieser Eigenschaft wird deshalb empfohlen, sie zuletzt der PCR-Reaktion zuzusetzen und die Heißstart-Methode zu verwenden [162]. Die in-vitro-Fehlerrate der Taq-Polymerase liegt bei einem falsch eingebauten Nukleotid pro 5000 Nukleotiden, wobei es sich hauptsächlich um Basenaustausche handelt. Deletionen oder Insertionen einer Base kommen sehr selten und komplexere Mutationen gar nicht vor [63]. Unter Berücksichtigung dieser Punkte wurde die Taq-DNA-Polymerase und nicht die Pwo-Polymerase für die Untersuchungen eingesetzt. Saka et al. [197] verwendeten für die Amplifizierung des RHO1-Gens bzw. bestimmter Abschnitte dieses Gens bei Hefepilzen ebenso die Taq-Polymerase wie Tanaka et al. [221] bei *Cryptococcus neoformans*. Dagegen setzten Drogonova et al. [46] für ihre Untersuchungen des RHO1-Gens bei *S. cerevisiae* die Pfu- und TaKaRa-DNA-Polymerase ein.

Für die Spezifität und Effektivität der PCR-Reaktion sind auch die am Thermocycler programmierten PCR-Bedingungen von entscheidender Bedeutung. Möglichkeiten zur Optimierung sind in der vorliegenden Arbeit im Kapitel 3.2.2 (s.S.42) ausführlich dargestellt. Theoretisch wird die gewünschte Sequenz erst ab dem dritten Zyklus gebildet, da ab diesem Zeitpunkt die Länge der Ziel-Sequenz durch die Primer vorgegeben ist. Danach erfolgt eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes, da jeder neusynthetisierte Strang als Kopie zur Verfügung steht. Zum Ende der Reaktion nimmt die Enzymmenge ab und es kommt zur Hybridisierung der synthetisierten Stränge untereinander, wodurch sich die Effektivität der Reaktion vermindert, da dann die Primer nicht binden können [162]. Es war somit wesentlich, die geeignete Anzahl an Zyklen herauszufinden, da bei einer hohen Anzahl nicht unbedingt eine größere Menge der Ziel-DNA entsteht, sondern mehr Artefakte gebildet werden. In dieser Arbeit wurde ein PCR-Zyklus bestehend aus Denaturierung, Annealing und Extension (s.Tab. 2-11; S.35) 32mal wiederholt.

Entscheidend für eine optimale PCR-Reaktion ist der zweite Reaktionsschritt während des PCR-Zyklus: das „Annealing“, in dem die Primer an die Matrizen-DNA binden. Einen Anhaltspunkt für die optimale Annealingtemperatur bietet die Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer, wobei eine Temperatur von 5°C unter dem Schmelzpunkt empfohlen wird. Allerdings kann diese Temperatur aufgrund der experimentellen Daten korrigiert und dann die höchste Temperatur gewählt werden, mit der man die besten Amplikons erhält [162;

63]. In den im Kapitel 3.2.2 (s.S.42) ausführlich dargestellten Versuchen zur Feststellung der optimalen Annealingtemperatur erwies sich eine Temperatur von 50°C bzw. 45°C als optimal, welche damit recht deutlich unter der für die Primer canrho1-5f und canrho1-3r berechneten Schmelztemperaturen von 65,1°C bzw. 59,3°C (s.Tab. 2-5; S.27) lag. Bei Temperaturen ab 55°C wurden eindeutig schlechtere Ergebnisse, d.h. in der Gelelektrophorese schwächere Banden, erzielt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die berechnete Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer wirklich nur als Anhaltspunkt dienen kann und in jedem Fall eine experimentelle Prüfung durchgeführt werden sollte.

Verschiedene Stoffe können die PCR inhibieren, dazu zählen u.a. Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin und Stuhl, aus denen die DNA gewonnen wird. Bei der Isolierung der DNA aus Blut sollte beachtet werden, dass es in EDTA- und nicht in Heparin-Röhrchen gesammelt wird, da Heparin die PCR stark hemmt [162]. Wie bereits erwähnt wurde (s. 4.1.2; S.88) kann die PCR auch durch bestimmte DNA-Präparationsmethoden gehemmt werden. So werden häufig nichtionische Detergentien zur Denaturierung und Zellyse verwendet, wie auch in der vorliegenden Arbeit Tween 20, die bei Konzentrationen bis zu 5% im wesentlichen keine Hemmung hervorrufen. Jedoch können andere ionische Detergentien, wie z.B. SDS die PCR schon bei deutlich geringeren Konzentrationen hemmen. Deshalb wird empfohlen, wie auch in dieser Arbeit durchgeführt, diese Detergentien vor der PCR mittels Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation wieder zu entfernen [162]. Eine Kontamination mit Fremd-DNA kann die PCR-Reaktion und somit das Ergebnis ebenfalls beeinflussen, um dies auszuschließen, wurde immer eine Negativkontrolle (alle Reagenzien ohne DNA) mitgeführt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in den beschriebenen Versuchen (s.Kapitel 3.2; S.41) erarbeiteten PCR-Bedingungen letztendlich zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führten, d.h. die erfolgreiche Amplifizierung des RHO1-Gens war in der Gelelektrophorese als kräftige, aussagefähige Bande erkennbar.

4.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Detektion des PCR-Produktes dient dem Nachweis, dass das gesuchte Gen bzw. die gesuchte DNA-Sequenz in den Proben vorhanden ist. Für den Nachweis des Amplikons gibt es verschiedene Methoden, die einfachste ist die Agarose- bzw. Polyacrylamid-gelelektrophorese. Dabei wird ein Teil des PCR-Produkts in dem Gel aufgetrennt und anschließend die Banden durch Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung oder UV-Licht sichtbar gemacht. Eine andere Methode zum Amplikonnachweis sind die Southern-Blot- oder Dot-Blot-Hybridisierung mit spezifischen z.B. radioaktiv markierten Sonden. Eine weitere

Technik zur Detektion der PCR-Produkte ist der immunologische Nachweis mittels ELISA. Diese Methoden sind im Vergleich zur Ethidiumbromidfärbung empfindlicher. Zu erwähnen ist auch die Möglichkeit des Nachweises amplifizierter DNA mittels Elektrochemolumineszenz [162]. Aufgrund der Einfachheit und Schnelligkeit der Methode wurde in dieser Arbeit die Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des amplifizierten RHO1-Gens und zum Nachweis der DNA-Fragmente nach Restriktion dieses Gens eingesetzt. Für den Nachweis des amplifizierten RHO1-Gens wurden 1,5%ige Agarosegele (s.Abb. 3-7; S.52) verwendet, womit sich das DNA-Fragment mit einer Größe von 597 bp sehr gut detektieren ließ. Dagegen zeigte sich im Verlauf der Experimente, dass zur Dokumentation und Differenzierung von DNA-Fragmenten im Bereich von etwa 80-100 bp, wie sie nach Restriktion des RHO1-Gens vorkamen (s.Abb. 3-26; S.72), 2,5%ige Agarosegele deutlich überlegen waren. Insgesamt erwies sich die Agarosegelelektrophorese als eine sehr geeignete Methode zum Nachweis des amplifizierten RHO1-Gens und von RFLP innerhalb dieses Gens bei verschiedenen *Candida* Spezies. Lugert et al. verwendeten in ihrer bereits erwähnten Studie ebenfalls 1,5%ige Agarosegele und Ethidiumbromidfärbung zur Detektion der PCR-Produkte [134].

4.1.5 Nachweis von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)

Die Restriktionsanalyse von PCR-Produkten, wie in dieser Arbeit vom amplifizierten RHO1-Gen bei *Candida*-Spezies, dient der Erkennung von RFLP. Bezüglich der Auswahl der geeigneten Restriktionsenzyme sind verschiedene Kriterien (s.3.1; S.40) zu berücksichtigen. Die publizierte RHO1-Sequenz von *C. albicans* [109] diente dafür als Grundlage. Die nach diesen Kriterien ausgewählten Enzyme sind in der Tab. 3-5 (S.55) aufgeführt, die zu erwartenden Schnittmuster veranschaulicht die Abb. 3-10 (S.55). Diese Enzyme erwiesen sich in der Auswertung der Ergebnisse zum Nachweis von RFLP innerhalb des RHO1-Gens bei *Candida* gut geeignet, da einerseits die einzelnen DNA-Fragmente aufgrund ihrer Länge gut zu differenzieren waren und andererseits die Schnittstellen der einzelnen Enzyme in unterschiedlichen Genabschnitten lagen, resultierend in verschiedenen Bandenmustern. Andere Arbeitsgruppen nutzten die Restriktionsanalyse von PCR-Produkten u.a. zur Identifizierung medizinisch wichtiger *Candida*-Spezies [149], zur Identifizierung von Subtypen innerhalb des Genotypes A von *C. albicans* [98] oder wie unsere eigene Arbeitsgruppe [70] zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Die RFLP-Analyse von PCR-Produkten ist somit ein bedeutsames methodisches Mittel sowohl für die Routinediagnostik, als auch für die Forschung.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Nachweis des RHO1-Gens und RFLP-Analyse bei *C. albicans*

Die Zielstellungen der vorliegenden Arbeit bestanden in einer Überprüfung des Vorkommens des RHO1-Gens bzw. RHO1-ähnlicher Gene in ausgewählten *Candida* Spezies mittels PCR und Gelelektrophorese, sowie dem Nachweis möglicher Mikroheterogenitäten innerhalb des RHO1-Gens bei verschiedenen *C. albicans* Stämmen mit Hilfe speziell ausgesuchter Restriktionsendonukleasen. Eine vergleichbare methodische Vorgehensweise wählten Kanbe et al. [96] für eine rasche Identifizierung und Unterscheidung zwischen *C. albicans*, *C. stellatoidea* und *C. dubliniensis*. Sie amplifizierten mittels PCR bestimmte repetitive Sequenzen (RPS), wobei sich für die drei genannten Spezies identische Amplifikationsprofile zeigten. Die nachfolgende Restriktionsanalyse der PCR-Produkte erbrachte Spezies-spezifische Restriktionsprofile.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde, haben die humanpathogenen *Candida*-Spezies, in den letzten Jahren im klinischen Alltag zunehmend an Bedeutung gewonnen (s.1.2, S.2). Das RHO1-Gen kodiert bei Hefen ein multifunktionelles Protein, das u.a. eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität der Proteinkinase C [95; 163; 172], der Zellpolarisation und Zellzyklusprogression der Hefezellen [46; 53; 125; 172], sowie der Zellmorphogenese und Neuorganisation des Aktinzytoskeletts [108; 93] spielt. Eine weitere wesentliche Funktion der durch das RHO1-Gen verschlüsselten GTPase ist, wie bereits mehrfach erwähnt, die Regulation der β -1,3-Glucan-Synthase, welche das Glucan, eine Hauptkomponente der Pilzzellwand, synthetisiert [109; 144; 45; 185; 125]. Aktuelle Untersuchungen lassen vermuten, dass RHO1 auch die β -1,6-Glucan-Synthase kontrolliert [234; 125; 172]. Smith et al. [210] konnten durch ihre experimentellen Ergebnisse beweisen, dass Rho1 sowohl für das Wachstum, als auch für die Lebensfähigkeit von *C. albicans* in vitro und in vivo essentiell ist. Sie zeigten, dass bei Mäusen mit systemischer Candidiasis für die Infektion und Kolonisation der Nieren Rho1p benötigt wird. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass RHO1 auch eine erhebliche Bedeutung für die Pathogenität von *Candida albicans* hat. Die genaue Identifizierung und Charakterisierung des RHO1-Gens ist auch für die Entwicklung eines spezifischen gegen pathogene Pilze, insbesondere gegen *C. albicans*, gerichteten β -1,3-Glucan-Synthase Inhibitors wertvoll, wie bereits von Kondoh [109] erwähnt wurde. Insbesondere Patienten mit chronischen Erkrankungen, die eine häufige systemische Antibiose oder Kortikoidtherapie benötigen, aber auch immunsupprimierte Patienten würden von einem spezifisch gegen *Candida*-Hefen wirksamen und gut verträglichen Antimykotikum profitieren. Die Zellwand der Pilze stellt ein wesentliches

potentielles Ziel für neue antimykotische Medikamente dar [69; 121]. Mit Caspofungin, dem ersten verfügbaren Vertreter der Echinocandine, ist bereits seit einiger Zeit ein Inhibitor der β -1,3-Glucan-Synthase verfügbar. Es wird vermutet, dass diese Substanzklasse ihre Wirkung über eine Hemmung der katalytischen Untereinheit des Enzyms, Fks1, entfaltet [43; 99]. Daher ist es auch vorstellbar, die durch das RHO1-Gen kodierte regulatorische Untereinheit der β -1,3-Glucan-Synthase, als Zielstruktur für neue Antimykotika zu prüfen, da vermutlich auch eine Störung dieses Proteins zu einem Funktionsverlust des Enzyms und damit zur Störung der Zellwandsynthese und zum Absterben der Pilzzelle führt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte zunächst ein Beitrag bezüglich des Vorkommens des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida*-Spezies geleistet werden. Daher war es zunächst erforderlich, dieses Gen mit geeigneten Methoden nachzuweisen. Die im Abschnitt 3.2 (s.S.41) ausführlich erläuterten erhöhten methodischen Anforderungen (Ermittlung der optimalen DNA-Präparationsmethode, Auswahl spezifischer Primer, Optimierung der PCR-Bedingungen) ermöglichen somit eine verbesserte molekulare Diagnostik, die wiederum die Grundlage für eine effektive Therapie bildet.

Zuerst wurden verschiedene *C. albicans* Stämme, die aus unterschiedlichen Patientenmaterialien isoliert worden waren, bezüglich des Vorkommens des RHO1-Gens getestet. Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte bei 29 der 30 untersuchten Stämme das RHO1-Gen erfolgreich amplifiziert werden (s.3.3.1;S.50). Nur bei dem Stamm S130 konnte das RHO1-Gen auch nach erneuter DNA-Präparation und wiederholter Durchführung der PCR nicht vervielfältigt werden. Für diesen Stamm war somit zu klären, ob die DNA dieses Stammes prinzipiell amplifizierbar ist. Diese Frage konnte, wie in der Abb. 3-9 (s.S.53) dargestellt, mittels Amplifizierung der DNA dieses Stammes mit dem Primerpaar 153/154 positiv beantwortet werden. Unter Verwendung dieses Primerpaares wird ein hoch konservierter Bereich des 18s rRNA-Gens von Pilzen amplifiziert [50;132]. Diese Oligonukleotidprimer binden an hoch konservierte Regionen der 18s rRNA bei über 500 verschiedenen Pilz-Spezies und sind daher hervorragend zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA eines bestimmten Hefepilz-Stammes geeignet. Bei *C. albicans* binden diese Primer zwischen den Positionen 544-563 bzw. 1033-1014 [50].

Worin liegen mögliche Ursachen, dass das RHO1-Gen bei dem Stamm S130 nicht nachgewiesen werden konnte?

Es wurden identische PCR-Bedingungen eingestellt, der einzige Unterschied bestand in der Wahl der verschiedenen Primerpaare. Da das RHO1-Gen der Positivkontrolle der PCR amplifiziert wurde liegt der Beweis vor, dass die gewählten PCR-Bedingungen eine

Vervielfältigung der DNA ermöglichen. Auch eine Kontamination der PCR-Reagentien durch DNA von zuvor amplifizierten Proben als zweite mögliche Ursache für das negative Ergebnis konnte durch die Negativkontrolle der PCR ausgeschlossen werden. Die wahrscheinlichste Ursache ist, dass das für die Amplifikation des RHO1-Gens spezifische Primerpaar 1/2 bei dem *C. albicans* Stamm S130 nicht binden konnte, da die Zielsequenz eines oder beider Oligonukleotide nicht vorkommt. Da das RHO1-Gen zu den essentiellen Genen von *C. albicans* [190; 210] zählt, war es sicherlich auch bei diesem Stamm vorhanden, da dieser ansonsten nicht lebensfähig wäre. Wie bereits erwähnt wurde, bewiesen Smith et al. in ihrer Arbeit, dass Rho1p für die Lebensfähigkeit von *C. albicans* in vitro und in vivo essentiell ist [210]. In einer anderen Arbeit wurden in großem Umfang essentielle Gene bei *C. albicans* nachgewiesen und ihre Einsatzmöglichkeiten bezüglich antimykotischer Therapie geprüft [190]. Unter Verwendung der GRACE™ Methode wurde das RHO1-Gen ebenfalls als essentielles Gen identifiziert. Diese Methode ermöglicht die transkriptionelle Hemmung von Tetrazyklin Promoter-regulierten Genen [190]. Römer et al. infizierten Mäuse mit *C. albicans* GRACE Stämmen und zeigten mittels Unterdrückung der Genexpression von RHO1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion, dass RHO1 als therapeutisches Target für die Therapie systemischer *C. albicans* Infektionen in Frage kommt [190].

Ein weiterer wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Fragestellung, ob innerhalb des RHO1-Gens bei verschiedenen *C. albicans* Stämmen Mikroheterogenitäten nachweisbar sind. Dazu wurde das PCR-Produkt jedes Stammes mit fünf verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und die entstandenen DNA-Fragmente (RFLP) des RHO1-Gens der verschiedenen *C. albicans* Stämme miteinander verglichen. Wie die im Abschnitt 3.4 (s.S.54) ausführlich dargestellten Ergebnisse belegen, zeigten die 29 untersuchten *C. albicans* Stämme ein identisches Ergebnis im Vergleich der Schnittmuster nach der Restriktion des RHO1-Gens mit dem jeweiligen Restriktionsenzym.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Banden in der Elektrophorese nach der Restriktion mit dem entsprechenden Enzym im Vergleich aller Stämme identische Lauflängen zeigten. Die RFLP-Analyse des RHO1-Gens bei *C. albicans* Stämmen erbrachte somit keinen Nachweis von Mikroheterogenitäten. Lediglich die Intensität der Banden variierte innerhalb der verschiedenen Stämme, was auf Unterschiede in der Anfärbung der DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid zurückzuführen ist.

4.2.2 Nachweis des RHO1-Gens bei weiteren *Candida*-Spezies

Eine weitere Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin zu prüfen, ob das RHO1-Gen mit denselben Methoden auch bei anderen *Candida*-Spezies vorhanden ist. Aufgrund der zunehmenden Bedeutung anderer *Candida*-Spezies neben *C. albicans* im klinischen Alltag, insbesondere bei abwehrgeschwächten Patienten, wie Diabetikern [97; 10], Frühgeborenen [236; 127; 230; 223; 55] und Krebspatienten [148; 115; 97; 181; 223], aber auch bei Patienten mit Organtransplantationen [115; 84; 56; 183] oder bei HIV-Infektion [228; 87; 35] erschien die o.g. Frage sowohl im Hinblick auf das „Pathogenitätspotential“ des RHO1-Gens als auch auf mögliche spätere therapeutische Konsequenzen bedeutsam und würde in ihrer Beantwortung eine entsprechende klinische Relevanz haben. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertationsschrift gab es keine Publikationen zu dieser Thematik.

Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, die belegen, dass das RHO1-Gen und die dadurch kodierten Funktionen des Proteins außer bei *Saccharomyces cerevisiae* [144; 45; 185] und bei *Candida albicans* [109] auch bei anderen Pilzen nachgewiesen werden konnte.

So ordnen sich hier beispielsweise die Ergebnisse von Nakano et al. [159] ein, die in ihrer Arbeit zwei RHO-Gene (rho1^+ und rho2^+) bei *Schizosaccharomyces pombe* isolierten und die zelluläre Funktion von Rho1 untersuchten. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass Rho1 sowohl in die Lokalisation der Aktinstücke und die Kontrolle der Zellpolarität, als auch in die Regulation der Septierung und in die Zellwandsynthese involviert ist. Die Resultate von Tanaka et al. präsentieren den Nachweis von Homologen der RAS- und RHO1-Gene bei einer anderen Pilzspezies: *Cryptococcus neoformans* [221]. Die Autoren konnten in ihrer Publikation aufzeigen, dass die hergeleitete Aminosäuresequenz des CnRho1-Gens einen hohen Grad an Übereinstimmung mit den Rho1-Proteinen anderer Pilzspezies hat, so beispielsweise zu 78% mit *C. albicans* und zu 77% mit *Schizosaccharomyces pombe*. Beauvais et al. sequenzierten und klonierten das RHO1- und das FKS1-Gen bei dem Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*. Die Aminosäuresequenz zeigte ebenfalls eine deutliche Homologie zu den Aminosäuresequenzen der RHO1-Proteine von *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* [14]. Das RHO1-Gen konnte darüber hinaus bei der Milchhefe *Kluyveromyces lactis* isoliert werden, wobei sich eine Übereinstimmung von 85% mit dem RHO1-Homolog bei *S. cerevisiae* zeigte [189]. Kürzlich gelang der Arbeitsgruppe von Argimon et al. der Nachweis des RHO1 Gens bei dem Zygomyceten *Mucor rouxii*. Die Proteinsequenz zeigte im Vergleich mit dem *C. albicans* Rho1p eine Übereinstimmung von 79,9% [7].

Die Tab. 2-9 (s.S.30) zeigt die 12 verschiedenen Spezies, die auf das Vorhandensein des RHO1-Gens untersucht wurden. Bezüglich der verwendeten Methoden wurden lediglich die PCR-Bedingungen im Vergleich zu den vorhergehenden Experimenten geringfügig verändert. Die durchgeführten Untersuchungen führten zu einem sehr interessanten Ergebnis. Bei den drei Stämmen: *Candida lusitanae* DSM 70102, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 und *Candida tropicalis* ATCC 201381 konnte eine im Vergleich zu einem bekannten *C. albicans*-Stamm RHO1-ähnliche Bande nachgewiesen werden, wie die Abb. 3-16 (s.S.62) veranschaulicht.

Von den anderen 9 Spezies, bei denen das RHO1-Gen nicht amplifiziert werden konnte, wurde nach erneuter Reinigung der DNA und Messung der DNA-Konzentration die PCR wiederholt. Das negative Versuchsergebnis bestätigte sich jedoch. An dieser Stelle erhob sich die Frage, ob diese negativen Ergebnisse richtig oder falsch negativ waren, d.h. ist die Ursache darin begründet, dass das RHO1-Gen bei diesen Pilz-Spezies tatsächlich nicht vorkommt oder ist die präparierte DNA der ausgewählten Stämme der verschiedenen Spezies nicht amplifizierbar? Zur Beantwortung dieser Frage wurde von diesen Spezies (s. Tab. 3-6, S.61) eine PCR mit dem Primerpaar 153/154 unter ansonsten unveränderten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Wie bereits an früherer Stelle erwähnt wurde, wird mit diesem Primerpaar ein bei einer Vielzahl von Pilzspezies hoch konservierter Abschnitt des 18s rRNA-Gens amplifiziert [132; 50]. Die Abb. 3-17 (s.S.63) zeigt bei allen Spezies das erwartete DNA-Fragment von 500 bp, womit die Amplifizierbarkeit der DNA der ausgewählten Stämme bewiesen war. Diese Befunde unterstützen die Schlussfolgerung, dass das für die Amplifizierung des RHO1-Gens spezifische Primerpaar $\frac{1}{2}$ bei diesen Pilzspezies nicht binden konnte, da die Zielsequenz der Primer und damit höchstwahrscheinlich das RHO1-Gen bei diesen *Candida* Spezies nicht vorkommt. Das Primerpaar $\frac{1}{2}$ war so konstruiert worden, dass das gesamte RHO1-Gen amplifiziert wird. Retrospektiv stellt sich die Frage, ob es bei den Spezies, wo dies nicht gelungen ist, interessant gewesen wäre, das Gen abschnittsweise zu untersuchen. Dazu hätte das RHO1-Gen beispielsweise in drei Abschnitte von ca. 200 bp eingeteilt und dementsprechend Primer konstruiert werden können.

Das Ergebnis des Nachweises einer dem RHO1-Gen bei *C. albicans* ähnlichen Bande konnte bei 5 weiteren *C. parapsilosis*-Stämmen, 4 *C. lusitanae*-Stämmen und 10 *C. tropicalis*-Stämmen (s. Tab. 2-1, S.23) nachgewiesen werden. Somit war es gelungen, den Nachweis des RHO1-Gens bei den drei *Candida*-Spezies: *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* ausnahmslos zu bestätigen. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Behauptung aufstellen, dass das RHO1-Gen außer bei *C. albicans* auch bei diesen drei

Candida-Spezies vorkommt, da im direkten Vergleich der DNA-Fragmente (s. Abb. 3-18, S.65 und Abb. 3-19, S.65), kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist.

Interessant wäre es festzustellen, ob zwischen dem klinischen Bild der Patienten, von denen die untersuchten *Candida*-Stämme isoliert wurden und der genetischen Einordnung der Stämme ein Zusammenhang besteht. Wenn die *Candida*-Stämme mit RHO1-Gen eine pathogene Relevanz haben, könnte sich das in einem unterschiedlichen klinischen Bild bei den Patienten ausdrücken. Eine andere Überlegung bezieht sich auf Unterschiede in der Sensitivität der Stämme gegen bestimmte Medikamente in Abhängigkeit davon, ob die Stämme Träger des RHO1-Genes sind oder nicht. Diese Auswirkungen hätten einen wichtigen therapeutischen Effekt. Falls das RHO1-Gen jedoch für die Art essentiell ist, müssten alle Stämme es besitzen, d.h. mit anderen Worten, dort wo wir es nicht finden, ist es so verändert, dass wir es mit unseren Methoden nicht detektieren können.

4.2.3 RFLP-Analyse des RHO1-Gens bei den *Candida*-Spezies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. lusitaniae*

Logischerweise führte dies zu der Überlegung, ob sich auch die Schnittmuster der DNA-Fragmente nach Restriktion des RHO1-Gens der *Candida*-Spezies untereinander gleichen und identisch sind mit dem einheitlichen Schnittmuster der *C. albicans*-Stämme?

Abweichungen der Schnittmuster der DNA-Fragmente nach Restriktion des amplifizierten RHO1-Gens würden folglich auf Unterschiede in der DNA-Sequenz hinweisen, was im nächsten Schritt anhand einer Sequenzanalyse der PCR-Produkte zu beweisen wäre. Wie die im Abschnitt 3.5.3 (s.S.67) detailliert dargestellten Ergebnisse zeigen, gab es im Vergleich der Schnittmuster der DNA-Fragmente nach Restriktion des RHO1-Gens Unterschiede zwischen den vier *Candida*-Spezies.

Das Restriktionsenzym VspI hat nur bei *C. parapsilosis* geschnitten (s.Abb. 3-23, S.69) und zeigt im Vergleich der Schnittmuster ein zu *C. albicans* identisches Bild. Die Größe der DNA-Fragmente liegt etwa in dem erwarteten Bereich von 76 und 521 bp. Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass es im Bereich der Schnittstelle des Enzyms innerhalb der RHO1-Gensequenz (s.Tab. 3-5, S.55) bei *C. lusitaniae* und *C. tropicalis* Sequenzunterschiede geben muss. Nach Restriktion des amplifizierten RHO1-Gens mit dem Enzym HpaII zeigte sich ein identisches Schnittmuster für *C. lusitaniae* und *C. albicans* (s.Abb. 3-24, S.70). Dagegen gibt es offensichtlich Abweichungen im Bereich der Schnittstelle dieses Enzyms bei den anderen zwei *Candida*-Spezies *C. parapsilosis* und *C.*

tropicalis. Die DNA-Fragmente haben eine andere Größe, so dass die Erkennungssequenz für das Enzym bei diesen Stämmen an einer anderen Position innerhalb der Gensequenz von RHO1 liegen muss. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte auch der Vergleich der Schnittmuster nach Restriktion des amplifizierten RHO1-Gens mit Cfr10I, wie die Abb. 3-25 (s.S.71) veranschaulicht. Daraufhin erhärtete sich der Verdacht, dass es bei *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* Abweichungen innerhalb der Sequenz des RHO1-Gens im Vergleich zur publizierten RHO1-Gensequenz bei *C. albicans* [109] gibt. Der Vergleich der RFLP der vier *Candida*-Spezies nach Restriktion des RHO1-Gens mit dem Enzym RsaI zeigte identische Schnittmuster für *C. albicans*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (s.Abb. 3-26, S.72). Ebenso präsentierten sich im Vergleich der RFLP nach Restriktion des RHO1-Gens mit dem Enzym BseNI deutliche Unterschiede, wie die

Abb. 3-27 (s.S.73) verdeutlicht. Das Schnittmuster der Spezies *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* führte zu der Vermutung, dass das Enzym innerhalb der Gensequenz mindestens zweimal schneidet und folglich die Erkennungssequenz für das Enzym an mehr als einer Position innerhalb der Gensequenz vorliegen muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es offensichtlich Unterschiede innerhalb der Gensequenz des RHO1-Gens im Vergleich der vier *Candida*-Spezies gibt. Es lässt sich aufgrund dieser experimentellen Ergebnisse allerdings nicht eindeutig feststellen, zwischen welchen *Candida*-Spezies der höchste Grad an Übereinstimmung in bezug auf das RHO1-Gen besteht, da die Restriktionsanalyse mit den fünf Enzymen zu unterschiedlichsten Ergebnissen geführt hat. Aus diesen Gründen war es erforderlich, diese experimentellen Ergebnisse mit Hilfe einer Sequenzanalyse der drei *Candida*-Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. lusitanae* DSM 70102 und *C. tropicalis* ATCC 201381 zu verifizieren. Außerdem sollte ein Vergleich dieser Sequenzen mit der publizierten RHO1-Gensequenz von *Candida albicans* [109] erfolgen. Zusätzlich war noch die Frage zu beantworten, ob die Analyse der Schnittstellen der Restriktionsenzyme innerhalb der Sequenzen mit den experimentellen Daten in Einklang gebracht werden kann.

4.2.4 Sequenzanalyse des RHO1-Gens bei den *Candida*-Spezies

C. lusitanae, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*

Die Ergebnisse der Sequenzierung der RHO1-ähnliche Bandenmuster enthaltenden *Candida*-Spezies sollten darüber hinaus zur Klärung der bereits am Anfang des Kapitels 3.6 (s.S.74) formulierten Fragen beitragen. Die Sequenzen der RHO1-ähnlichen Amplikons der *Candida*-Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. lusitanae* DSM 70102 und *C. tropicalis*

ATCC 201381 wurden im Vergleich zur publizierten Sequenz des RHO1-Gens bei *C. albicans* [109] analysiert, wie im Abschnitt 3.6 (s.S.74) ausführlich dargestellt wurde.

Im Vergleich der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons des Stammes *C. parapsilosis* ATCC 90018 mit der RHO1-Sequenz von *C. albicans* [109] fielen an verschiedenen Stellen Unterschiede auf, die daraufhin einer näheren Analyse unterzogen worden sind (s.Tab. 3-7, S.79). Besonders ungewöhnlich war in diesem Zusammenhang die Abweichung am Ende der Aminosäuresequenz ab Position 194. Da dieser Bereich größtenteils der Sequenz des 3'-5' Oligonukleotidprimers entspricht, dürften dort keine Unterschiede auftreten. Die detaillierte Analyse des entsprechenden Abschnittes der Nukleotidsequenz zeigte einen Einschub zweier Nukleotide an den Positionen 581 und 582 der Nukleotidsequenz des Stammes *C. parapsilosis* ATCC 90018, der bei den anderen drei *Candida*-Spezies nicht nachzuweisen war (s. Kapitel 3.6.2, S.78). Infolge dieses Einschubes kam es zur Verschiebung des Leserasters, weil definitionsgemäß drei aufeinanderfolgende Nukleotide, das sogenannte Nukleotidtriplett oder Codon, für eine Aminosäure kodieren. Als Konsequenz kam es zur Änderung der Aminosäuresequenz. Wie bereits im Abschnitt 3.6.2 schematisch dargestellt wurde, führt die theoretische Entfernung der als Einschub vorhandenen Nukleotide zur „erwarteten Aminosäuresequenz“. Da sich der Einschub nur zwei Nukleotide vor Beginn des Oligonukleotidprimers (...TGTGTT...) befindet, ist keine exakte Aussage darüber möglich, ob sich die nachfolgende Nukleotidsequenz durch diesen Einschub verändert. Über den Bereich des Primers, der innerhalb der Gensequenz liegt, kann man keine Aussage treffen, da dieser Bereich vorgegeben ist. Es folgen jedoch nach dem Einschub der Nukleotide „TD“ noch zwei mit der RHO1-Sequenz von *C. albicans* übereinstimmende Nukleotide „...AA...“, weshalb man davon ausgehen kann, dass der Primer korrekt an die Sequenz gebunden hat.

Zusammenfassend lässt sich dennoch feststellen, dass zwischen der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons des Stammes *C. parapsilosis* ATCC 90018 und der bekannten RHO1-Sequenz von *C. albicans* eine Übereinstimmung von über 90% besteht und es sich somit um ein Homolog des RHO1-Gens handelt.

Ein interessantes Resultat erbrachte auch der Vergleich der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons des Stammes *C. tropicalis* ATCC 201381 mit der RHO1 Sequenz von *C. albicans*. Es konnten nur an zwei Positionen Unterschiede innerhalb der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz nachgewiesen werden (s.Tab. 3-8,S.80). Aus diesem Grund kann mit großer Sicherheit festgestellt werden, dass es sich auch bei diesem Stamm um ein Homolog des RHO1-Gens von *C. albicans* handelt.

Am schwierigsten gestaltete sich die Analyse der Aminosäuresequenz des RHO1-ähnlichen Amplikons des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 im Vergleich zur RHO1-Sequenz von *C. albicans*. Die offensichtlichen Unterschiede in der Sequenzfolge waren bedingt durch Nukleotideinschübe bzw. fehlende Nukleotide, aber auch durch eindeutige Nukleotidabweichungen, wie bereits im Kapitel 3.6.2 (s.S.78) ausführlich dargestellt wurde. Insbesondere zwei Abschnitte waren auffällig, der erste Bereich begann an Position 15 und der zweite an Position 119 der Aminosäuresequenz (s. Abschnitt 3.6.2). Es wurde vermutet, dass es durch den Einschub oder die Deletion eines Nukleotids zur Verschiebung des Leserasters und damit zur Veränderung der Aminosäuresequenz gekommen war. Als mögliche Ursachen sind einerseits ein Frame-Shift am Anfang der Sequenz, andererseits auch eine Chimärenbildung bei der PCR zu berücksichtigen. Wie die ausführlichen Darstellungen im Ergebnisteil (s. Kapitel 3.6.2, S.78) beweisen, konnten während der Analyse der Aminosäuresequenz und der dieser entsprechenden Nukleotidsequenz drei Nukleotideinschübe als Ursache für die Sequenzunterschiede nachgewiesen werden. Diese haben zur Verschiebung des Leserasters und somit zum Frame-shift geführt.

Im Resümee ist festzustellen, dass die nach den detailliert beschriebenen Änderungen resultierende Sequenz des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 im Vergleich mit der RHO1-Sequenz von *C. albicans* nun eine prozentuale Übereinstimmung von 88,9% zeigt. Damit ist davon auszugehen, dass es sich auch bei diesem Stamm mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Homolog des RHO1-Gens handelt.

Die bei *C. lusitaniae* im Vergleich zu den anderen *Candida*-Spezies deutlicher ausgeprägten Sequenzabweichungen und infolgedessen, wie später noch dargestellt wird, abweichenden Restriktionsprofile (s.4.2.5, S.105), lassen sich phylogenetisch erklären. Die *Candida*-Pilze zählen zu den Hemiascomyceten und innerhalb dieser werden sie den Saccharomycetales zugeordnet [117]. Bei Betrachtung evolutionärer Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den pathogenen *Candida*-Spezies zeigt sich, dass es bezüglich des Verwandtschaftsgrades zu *C. albicans* Unterschiede gibt. Eine Sequenzanalyse kleiner rRNA-Untereinheiten für 10 der zu den klinisch wichtigsten *Candida*-Spezies zählenden Arten erbrachte einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*, jedoch im Vergleich dazu nur eine entferntere Verwandtschaft für *C. lusitaniae* [13]. Diese Ergebnisse werden auch in einer aktuelleren Arbeit von Diezmann et al. [40] bestätigt. Die kombinierte Analyse der 18S rDNA und 26S rDNA von 73 Ascomyceten zeigte ebenso wie eine kombinierte höchstwahrscheinliche Analyse von 6 Genen (ACT1, EF2, RPB1, RPB2, 18S rDNA, 26S rDNA) für 38 Hemiascomyceten eine entferntere Verwandtschaft von *C. lusitaniae*

im Vergleich zu den eng verwandten *Candida*-Spezies: *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* [40].

Zusammenfassend lässt sich dennoch in Anbetracht der Ergebnisse der Sequenzanalyse die zu Beginn des Kapitels 3.6 (s.S.74) gestellte Frage beantworten: es handelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei dem RHO1-ähnlichen Bandenmuster der drei Spezies: *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* im Vergleich zu *C. albicans* um das RHO1-Gen.

Unterstützt wird diese Behauptung auch durch die nachfolgenden Literaturdaten.

Allen G-Proteinen gemeinsam ist die, konservierte Sequenzmotive enthaltene, sogenannte Guaninnukleotidbindende Domäne [229]. Diese Region wird in die Abschnitte G1-G5 eingeteilt und ist entscheidend für den GDP/GTP-Austausch, GTP-induzierte konformative Änderungen und die Hydrolyse von GTP [23]. Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Kondoh et al. [109], die in ihrer Arbeit zeigten, dass das RHO1-Gen von *Candida albicans* alle der Konsensussequenzen beinhaltet, die innerhalb der Rho-Typ GTPasen konserviert sind. Diese Feststellung verdeutlichen die Autoren schematisch in ihrer Publikation [109] im Vergleich zu den Aminosäuresequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* Rho1p und *Homo sapiens* RhoA, bei denen diese Domänen ebenfalls vorhanden sind. Ein weiteres konserviertes Sequenzmotiv ist die Stelle der spezifischen ADP-Ribosylierung durch das C3 Exoenzym-Toxin von *Clostridium botulinum*, Asn42 bei menschlichem RHOA [7].

An dieser Stelle erhebt sich die Frage, ob sich diese konservierten Sequenzmotive auch bei den Aminosäuresequenzen des jeweiligen RHO1-Gens der *Candida*-Spezies *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* nachweisen lassen?

In der folgenden Abb. 4-1 (s.S.104) ist der zum Asn42 bei RHOA korrespondierende Bereich der ADP-Ribosylierung bei allen vier *Candida* Spezies enthalten. Wie die in der Abb. 4-1 (s.S.104) rot markierten Bereiche beweisen, lassen sich diese, wie in der Arbeit von Kondoh et al. (Fig.3) [109] mit G1 bis G5 und „geranylgeranylation site“ bezeichneten Domänen, auch bei den RHO1-Homologen der *Candida* Spezies: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. lusitaniae* nachweisen.

		Asn 42	
	G 1	G 2	
C.lusi.	MVNGPAELRRKLVIV GDGACGK TCLLIVFSKGTFFPE VYVPTV FENYVADVEVDGRKVELA		60
C.para.	MVNGPAELRRKLVIV GDGACGK TCLLIVFSKGTFFPE VYVPTV FENYVADVEVDGRKVELA		60
C.trop.	MVNGPAELRRKLVIV GDGACGK TCLLIVFSKGTFFPE VYVPTV FENYVADVEVDGRKVELA		60
Rho1	MVNGPAELRRKLVIV GDGACGK TCLLIVFSKGTFFPE VYVPTV FENYVADVEVDGRKVELA		60
	G 3		
C.lusi.	LW DTAGQ EDYDRLRPLSYPDSNVILICFSIDSPDSLNDNVLEKWI SEVLHFCQGVPIILVG		120
C.para.	LW DTAGQ EDYDRLRPLSYPDSNVILICFSVDSPLSDNVLEKWI SEVLHFCQGVPIILVG		120
C.trop.	LW DTAGQ EDYDRLRPLSYPDSNVILICFSVDSPLSDNVLEKWI SEVLHFCQGVPIILVG		120
Rho1	LW DTAGQ EDYDRLRPLSYPDSNVILICFSVDSPLSDNVLEKWI SEVLHFCQGVPIILVG		120
	G 4	G 5	
C.lusi.	CKSDL XNXXATIKALVQENQQPVSS-SEGEAVAQKIGTQY----YL ECSA RTGQGVREVF		175
C.para.	CKSDL RDDPHTIEALRQHQQQPVST-SEGQAVAQKIGAAD----YL ECSA KTGRGVREVF		175
C.trop.	CKSDL RDDPHTIEALRQQQQQPVSS-SEGQEVAQRIGAAD----YL ECSA KTGRGVREVF		175
Rho1	CKSDL RDDPHTIEALRQQQQQPVST-SEGQQVAQRIGAAD----YL ECSA KTGRGVREVF		175
C.lusi.	ETATRASLVXKEKKEKKEK---- CVVL *		199
C.para.	EATRASLRAKDKKEKXKK---- CVVL *		199
C.trop.	EATRASLRVKEKKEKKEK---- CVVL *		199
Rho1	EATRASLRVKEKKEKKEK---- CVVL *		199
	Geranylgeranylation site		

Abb. 4-1: Markierung der konservierten Domänen bei Rho-Typ GTPasen (G1, G2, G3, G4 und geranylgeranylation site) bei *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. tropicalis* ATCC 201381 und *C. albicans* [GenBank Nr. D86430]

Es findet sich lediglich an der Aminosäureposition 166 des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 eine Abweichung. Bei diesem Stamm ist an dieser Position die Aminosäure Arginin (R) lokalisiert, während bei *C. albicans* und den anderen zwei *Candida*-Spezies die Aminosäure Lysin (K) vorhanden ist. Sowohl diese Befunde, als auch die Tatsache, dass die Aminosäuresequenz des Stammes *C. parapsilosis* ATCC 90018 zu über 90%, des Stammes *C. tropicalis* ATCC 201381 zu 99% und des *C. lusitaniae* DSM 70102 Stammes zu fast 89% identisch sind mit dem Rho1p von *C. albicans* beweisen die Vermutung, dass es sich bei dem experimentell nachgewiesenen, zum RHO1-Gen von *C. albicans* ähnlichen Bandenmuster um Homologe des RHO1-Gens von *C. albicans* handelt.

Einen weiteren Beweis liefert die Tatsache, dass am C-terminalen Ende der Sequenzen (s.Abb. 4-1,S.104) das für RHO-GTPasen typische Sequenzmotiv CAAX vorhanden ist. Dabei steht C für die Aminosäure Cystein, A ist in der Regel eine aliphatische Aminosäure und X kann eine beliebige Aminosäure sein [90]. Bei den in der Abb. 4-1 dargestellten RHO1-Sequenzen von *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* und *C. tropicalis* steht V für die

Aminosäure Valin und L für die Aminosäure Leucin, dadurch ergibt sich das Sequenzmotiv CVVL. Diese spezifische Erkennungssequenz dient als ein Signal für die posttranslationelle Modifikation des Proteins. Generell wird durch das X in dem Sequenzmotiv CAAX determiniert, ob die Modifikation eines Proteins durch die Farnesyltransferase oder die Geranylgeranyltransferase erfolgt [257]. Befindet sich an dieser Stelle ein L für Leucin erfolgt die Prenylation durch die Geranyltransferase Typ I [257]. Diese Modifikation ist einerseits für die Aktivierung der Proteine erforderlich und ermöglicht andererseits die Verankerung des RHO-Proteins an der inneren Seite der Plasmamembran [231]. Die Geranyltransferase I wird auch als potentielles Ziel in der Entwicklung neuer Antimykotika betrachtet [102]. Erwartungsgemäß ist auch bei dem RHO1-Protein anderer Spezies am C-terminalen Ende das CAAX-Motiv lokalisiert, z. B. bei *Trypanosoma cruzi* [161], *Schistosoma mansoni* [231], *Kluyveromyces lactis* [189] und *Cryptococcus neoformans* [221].

4.2.5 Diskussion der RFLP des RHO1-Gens im Vergleich zur Sequenzanalyse bei den *Candida*-Spezies *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*

Im Mittelpunkt der folgenden Betrachtungen steht die Beantwortung der Frage, ob sich die Abweichungen in den Sequenzen der drei *Candida*-Spezies im Vergleich zur publizierten RHO1-Gensequenz [109] von *C. albicans* auf bestimmte Abschnitte des Gens konzentrieren.

Wie bereits in der Tab. 3-9 (s.S.86) schematisch gezeigt wurde, häufen sich die Unterschiede in der Aminosäuresequenz besonders im Bereich zwischen den Positionen 138 bis 150, wenn man eine komplexe Betrachtungsweise der o.g. drei Spezies im Vergleich mit *C. albicans* RHO1 [109] wählt. Ursächlich für die Änderung der jeweiligen Aminosäure ist in der Regel der Austausch eines Nukleotids. Interessanterweise lag die Schnittstelle des Restriktionsenzym BseNI in diesem Bereich, dieses Enzym schneidet an Position 424 der Nukleotidsequenz. Im Vergleich der Schnittmuster der 29 untersuchten *C. albicans* Stämme waren keine Unterschiede zu finden. Möglicherweise haben geringe Veränderungen in diesem Bereich keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins. Auch bei den Stämmen *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 hat das Enzym u.a. an dieser Position geschnitten. Lediglich bei *C. lusitaniae* DSM 70102 lag die Schnittstelle an anderer Position, was sich auch an einem veränderten Bandenmuster zeigte. Die Bedeutung dieser Abweichungen ist gegenwärtig noch unklar.

Abschließend war noch die Frage zu beantworten, ob es mit Hilfe der Sequenzanalyse eine Erklärung für die unterschiedlichen Schnittmuster (RFLP) bei den *Candida*-Spezies nach Restriktion des RHO1-Gens mit den fünf verschiedenen Restriktionsendonukleasen gibt?

Unter Verwendung der Funktion MAP des Computerprogramms HUSAR war es möglich zu untersuchen, an welchen Positionen innerhalb der Gensequenz des RHO1-Gens die Enzyme schneiden. In der folgenden Abb. 4-2 (s.S.107) wird die Nukleotidsequenz des RHO1-Gens von *C. albicans* (GenBank Nr. D86430) mit der dazugehörigen Aminosäuresequenz abgebildet. Mit Hilfe der Buchstaben a, b und c am Beginn der Aminosäuresequenzen werden die drei „frames“, d.h. die drei verschiedenen Leseraster gekennzeichnet. Die jeweiligen Schnittstellen der Enzyme sind in der Darstellung markiert worden. Auf die gleiche Art und Weise erfolgte die Auswertung der Schnittstellen der Enzyme bei den anderen *Candida*-Spezies. Außerdem wurden diese theoretisch bestimmten Schnittstellen und die daraus resultierenden Größen der DNA-Fragmente mit den experimentellen Ergebnissen verglichen.

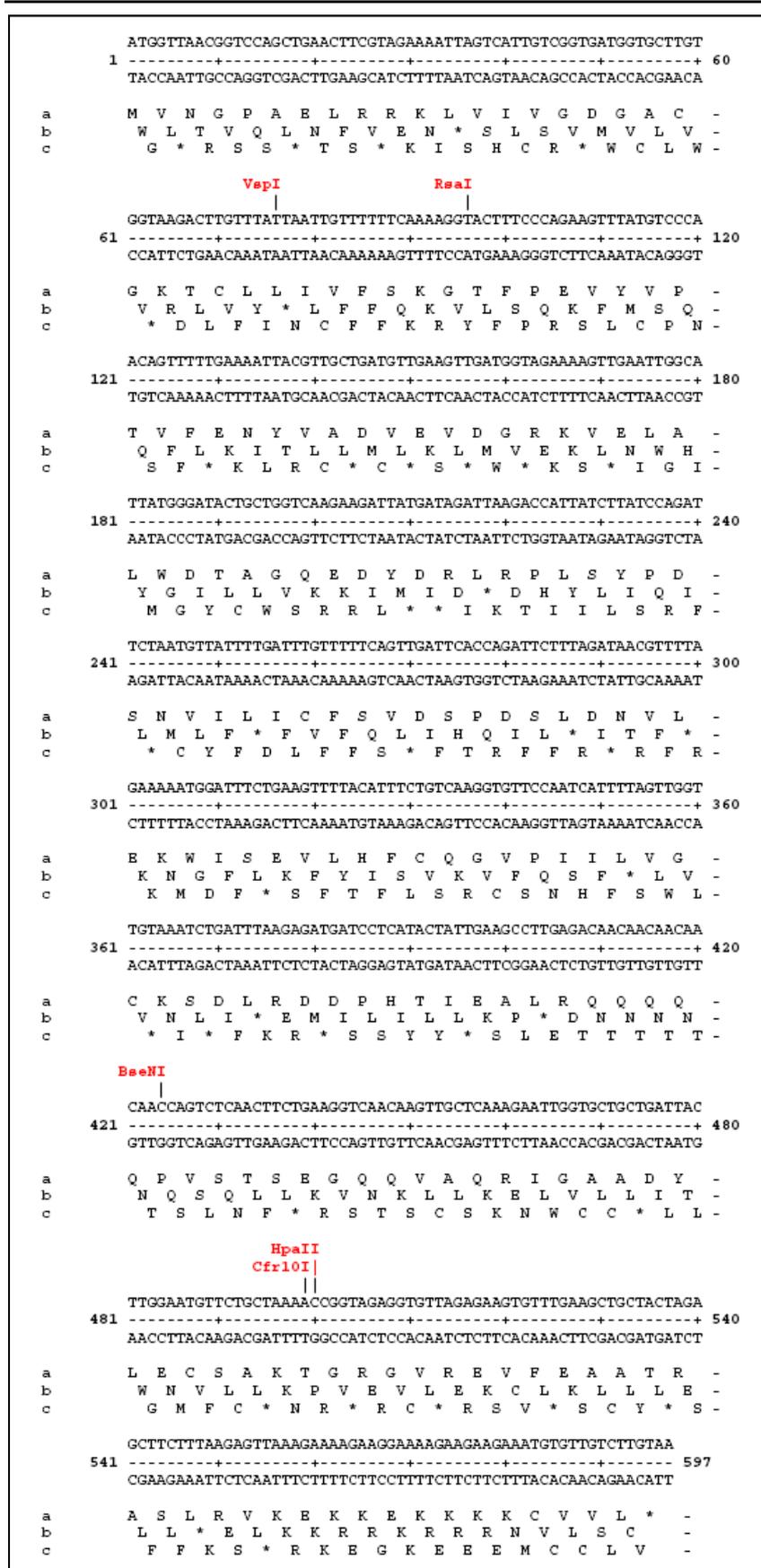


Abb. 4-2: MAP von *C. albicans* RHO1, [Genbank-Nr.: D86430]

Da im Abschnitt 4.2.3 (s.S.99) bereits die experimentellen Ergebnisse nach Restriktion des RHO1-Gens der *Candida*-Spezies jeweils beziehungsweise auf die unterschiedlichen Schnittmuster nach Restriktion mit einem Enzym erfolgte, soll auch die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse in ähnlicher Art und Weise geschehen.

Wie bereits erläutert wurde, hat das Restriktionsenzym VspI nur bei den Spezies *C. albicans* und *C. parapsilosis* (ATCC 90018) geschnitten. Der direkte Vergleich der Größe der DNA-Fragmente hat für beide Spezies ein identisches Bild ergeben, sie liegen in dem erwarteten Bereich von 76 und 521 bp. In den Abb. 4-2 (s.S.107) und Abb. 4-3 (s.S.109) ist die Schnittstelle dieses Enzyms an Position 76 der RHO1-Sequenz dargestellt. Die Erkennungssequenz für das Enzym liegt somit bei beiden Spezies an identischer Stelle. Es konnte außerdem das experimentelle Ergebnis bestätigt werden, dass dieses Enzym innerhalb der Sequenz der Stämme *C. tropicalis* ATCC 201381 und *C. lusitanae* DSM 70102 nicht schneidet, wie in den Abb. 4-4; (s.S.110) und Abb. 4-5 (s.S.112) verdeutlicht wird.

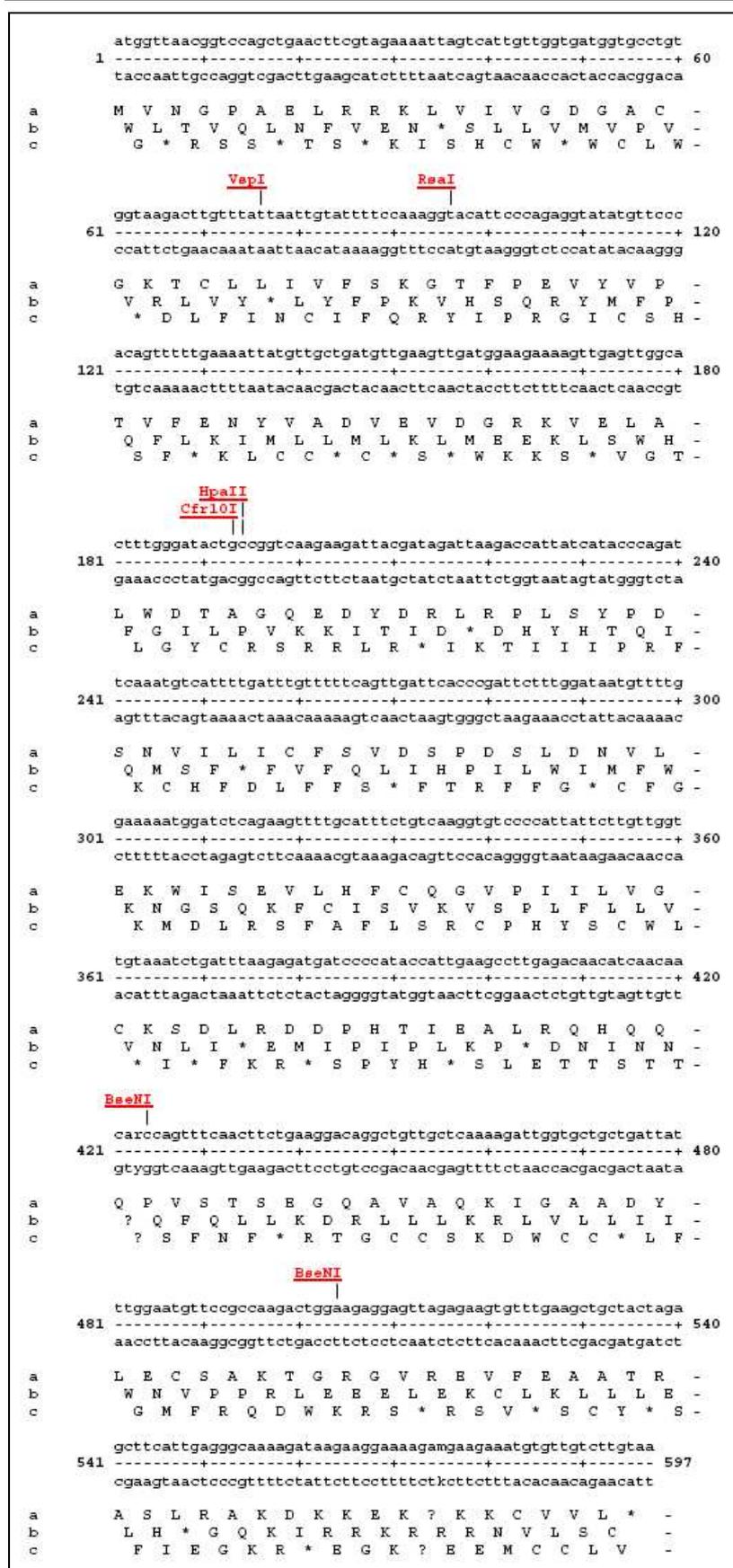


Abb. 4-3: MAP des RHO1-Gens von *C. parapsilosis* ATCC 90018

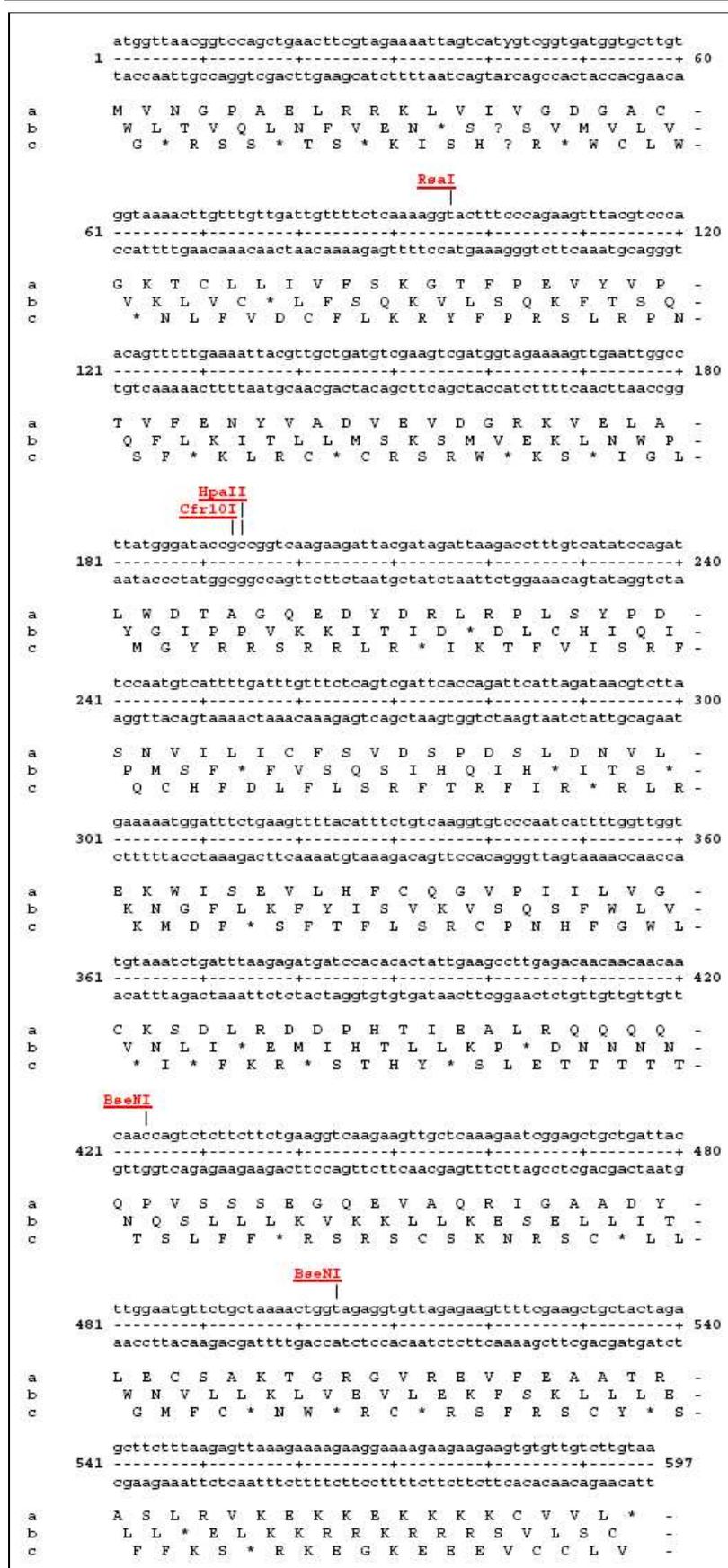


Abb. 4-4: MAP des RHO1-Gens von *C. tropicalis* ATCC 201381

Die RFLP des RHO1-Gens nach Restriktion mit dem Enzym HpAII (s.Abb. 3-24,S.70) konnten durch die theoretische Analyse der Schnittstelle innerhalb der Sequenzen der untersuchten *Candida*-Spezies ebenfalls bestätigt werden. Das Enzym schneidet bei *C. albicans* (GenBank Nr. D86430) und *C. lusitaniae* DSM 70102 an der Position 500. Die DNA-Fragmente zeigten eine Lauflänge von 500 und 120 bp. Dagegen liegt die Erkennungssequenz für dieses Enzym und damit auch die Schnittstelle innerhalb der Sequenzen der anderen beiden Spezies *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* an Position 194, damit ist eine DNA-Fragmentgröße von 194 und 403 bp zu erwarten. Wie in der Abb. 3-24 (s.S.70) veranschaulicht wird, zeigten die Banden nach Restriktion mit HpAII eine Lauflänge von 210 und 420 bp, womit die erwartete Lauflänge bestätigt wird. Es ist lediglich festzustellen, dass die Banden insgesamt etwas zu kurz gelaufen sind, was durch die Tatsache bestätigt wird, dass die Bande der ungeschnittenen DNA bei 620 bp liegt. Erwartungsgemäß müsste diese bei 597 bp lokalisiert sein.

Ein im Vergleich dazu ähnliches Ergebnis erbrachte die Analyse der Schnittstellen des Enzyms Cfr10I. Auch in diesem Fall konnte das experimentelle Resultat bestätigt werden. Das identische Bild der DNA-Fragmente für *C. albicans* (GenBank Nr. D86430) und *C. lusitaniae* DSM 70102 mit einer Lauflänge der Banden von 510 und 110 bp entspricht der zu erwartenden Fragmentgröße von 499 und 98 bp, da das Enzym bei diesen Spezies an Position 499 der Sequenz schneidet. Im Gegensatz dazu schneidet es bei *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 an Position 193, somit beträgt die erwartete Größe der DNA-Fragmente 193 und 404 bp. Wie der Abb. 3-25 (s.S.71) zu entnehmen ist, zeigen die DNA-Fragmente dieser Stämme nach der Restriktion eine Größe von 200 und 400 bp und bestätigen damit das theoretische Ergebnis.

Die Sequenzanalyse hat für das Enzym RsaI ergeben, dass es bei den Spezies *C. albicans*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* an Position 96 der RHO1 Sequenz schneiden müsste und folglich die Größe der DNA-Fragmente 96 und 501 bp betragen muss. Bei dem *C. lusitaniae* DSM 70102 Stamm befindet sich die Schnittstelle dagegen an Position 468, womit eine Lauflänge der Banden von 468 und 129 bp zu erwarten ist. Auch dieses u.a. in der Abb. 4-5 (s.S.112) schematisch dargestellte Ergebnis beweist die Richtigkeit der experimentell erhobenen Daten nach Restriktion des RHO1-Gens der vier Spezies (s.Abb. 3-26,S.72).

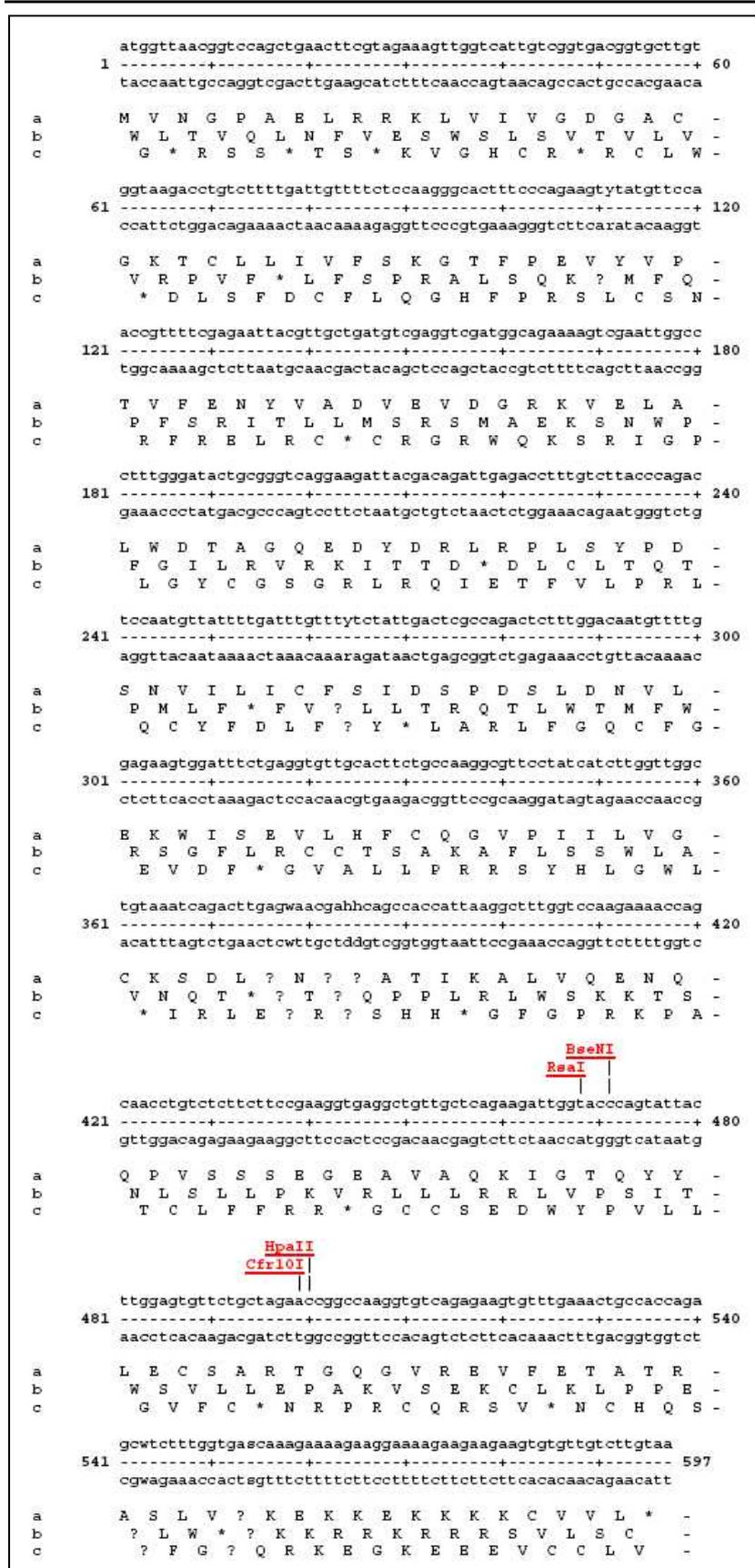


Abb. 4-5: MAP des RHO1-Gens von *C. lusitaniae* DSM 70102

Abschließend ist noch die Frage offen, ob sich auch die unterschiedlichen RFLP nach Restriktion des RHO1-Gens mit dem Enzym BseNI durch die Sequenzanalyse der untersuchten *Candida*-Spezies bestätigen lassen?

Das Schnittbild bei *C. albicans* entspricht mit den DNA-Fragmenten einer Größe von ca. 450 und 200 bp ungefähr den erwarteten Größen von 424 und 173 bp. Im Gegensatz dazu betrug die Größe der DNA-Fragmente bei *C. lusitaniae* DSM 70102 etwa 500 und 150 bp. Die Analyse der entsprechenden Sequenz zeigt, dass die Schnittstelle des Enzyms bei diesem Stamm an Position 471 lokalisiert ist. Damit wird das experimentelle Ergebnis bestätigt, da die zu erwartende Größe der DNA-Fragmente somit 471 und 126 bp beträgt. Ein im Vergleich dazu abweichendes Schnittmuster mit drei DNA-Fragmenten von etwa 450, 100 und 90 bp ist bei *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* ATCC 201381 zu finden (s.Abb. 3-27, S.73). Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass in diesem Fall das Enzym mindestens zweimal schneidet. Interessanterweise lassen sich innerhalb der entsprechenden Sequenzen tatsächlich zwei Schnittstellen nachweisen, wie in der Abb. 4-3 (s.S.109) und Abb. 4-4 (s.S.110) verdeutlicht wird. Die erste Schnittstelle liegt wie bei *C. albicans* an Position 424, die zweite ist an Position 504 zu finden. Daraus ergeben sich nach Restriktion des RHO1-Gens bei den beiden Stämmen DNA-Fragmente mit einer Größe von 424, 80 und 93 bp. Unter der Berücksichtigung, dass die Banden insgesamt etwas zu kurz gelaufen sind, wurden die experimentellen Ergebnisse erneut bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit Hilfe der Sequenzanalyse der Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. tropicalis* ATCC 201381 und *C. lusitaniae* DSM 70102 im unmittelbaren Vergleich mit der publizierten RHO1-Sequenz von *C. albicans* (GenBank Nr. D86430) [109] gelungen ist, die experimentellen Ergebnisse der RFLP nach Restriktion des RHO1-Gens mit den Enzymen VspI, HpaII, Cfr10I, RsaI und BseNI zu bestätigen. Die unterschiedlichen RFLP nach Restriktion mit dem jeweiligen Enzym im Vergleich der vier *Candida*-Spezies konnten durch Verschiebungen oder sogar das Fehlen der Schnittstellen für das jeweilige Enzym infolge von Abweichungen in der Nukleotidsequenz begründet werden. Allerdings hat nicht jede Änderung der Nukleotidsequenz, die zur Änderung oder zum Fehlen der Schnittstelle für ein Restriktionsenzym führte, auch die Änderung der Aminosäuresequenz im Vergleich zur publizierten RHO1-Sequenz von *C. albicans* [109] zur Folge gehabt. Die Ursache dafür liegt darin begründet, dass bestimmte Aminosäuren durch mehrere unterschiedliche Nukleotidtripletts bzw. Codons verschlüsselt werden können. Möglicherweise handelt es sich bei den RFLP um Spezies-spezifische Restriktionsprofile innerhalb des RHO1-Gens bei den untersuchten *Candida* Spezies. Es wäre sicherlich interessant, dies an einer größeren Auswahl von Stämmen dieser Spezies zu überprüfen.

4.2.6 Ausblick

Diese Arbeit befasst sich mit der Bedeutung des RHO1-Gens und seiner experimentellen Darstellung in Hefepilzen, in denen es ein multifunktionelles Protein kodiert. Als regulatorische Komponente der β -1,3-Glucan-Synthase bei *C. albicans* ist dieses Protein entscheidend an der Zellwandsynthese beteiligt [45;185]. Das Vorkommen des RHO1-Gens bei *C. albicans* wurde in der vorliegenden Arbeit mittels PCR, unter Verwendung speziell zur Amplifizierung dieses Gens kreierter Primer, und Agarosegelelektrophorese bestätigt. Erstmals war es außerdem gelungen, das RHO1-Gen auch bei anderen *Candida*-Spezies, nämlich bei *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. lusitaniae* nachzuweisen. Durch eine Sequenzanalyse dieser Amplikons wurde bewiesen, dass es sich dabei um Homologe des *C. albicans* RHO1-Gens handelt. Darüber hinaus wurde durch eine Restriktionsanalyse dargestellt, dass es innerhalb des RHO1-Gens dieser Spezies RFLP gibt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant weiter zu untersuchen, ob es sich dabei um Spezies-spezifische Restriktionsprofile handelt. Dazu bietet es sich an, eine größere Anzahl an Stämmen dieser Spezies mit denselben Methoden zu überprüfen. Dies würde weiter zur Klärung sowohl des Vorkommens des RHO1-Gens, als auch von RFLP innerhalb des RHO1-Gens bei humanpathogenen *Candida*-Spezies beitragen. Außerdem wären diese Untersuchungen auch im Hinblick darauf von Nutzen, ob sich das RHO1-Gen bei *Candida* als potentiell Ziel für die Entwicklung neuer Antimykotika anbietet. Die Arbeit von Römer et al. hat gezeigt, dass RHO1 ein potentiell Target dafür darstellt [190]. Angesichts dieser weiterführenden Überlegungen wäre es jedoch auch wichtig zu überprüfen, ob eine medikamentöse Inhibition von Funktionen des RHO1-Gens und ein daraus resultierendes Absterben der *Candida*-Pilze möglich ist, ohne gleichzeitig Funktionen des RHO1-Homologs beim Menschen RHOA zu beeinflussen. Zwischen RHOA und RHO1 (*C. albicans*) besteht eine Sequenzidentität von 71,5% [109]. Eine Beeinflussung von Funktionen beider Gene könnte daher neben der erwünschten antimykotischen Wirkung auch zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Da es jedoch für bestimmte Enzyme, die in die Zellwandsynthese bei Pilzen involviert sind, beim Menschen kein Äquivalent gibt [116], wäre eine gezielte Inhibition der Funktion von RHO1 als regulatorische Komponente der β -1,3-Glucan-Synthase in der Zellwandsynthese theoretisch vorstellbar. Möglicherweise lassen sich diese Überlegungen an einem geeigneten experimentellen Tiermodell überprüfen.

5 Zusammenfassung

Candida albicans ist der wichtigste humanpathogene Vertreter dieser Pilzspezies, wobei in den letzten Jahren auch andere *Candida*-Spezies zunehmend als Erreger lokaler und systemischer Pilzinfektionen an Bedeutung im klinischen Alltag gewonnen haben. Bestandteile und funktionelle Eigenschaften der Zellwand der *Candida*-Pilze sind essentiell für deren Pathogenität und für das Überleben dieses Mikroorganismus. Darüber hinaus hat die Zellwand als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antimykotika zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Hauptkomponente der Zellwand, das Glucan, wird durch die β -1,3-Glucan-Synthase gebildet. Die regulatorische Komponente dieses Enzyms wird durch das RHO1-Gen kodiert. Darüber hinaus reguliert dieses multifunktionelle Protein weitere wichtige Signaltransduktionswege in der Hefezelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen des RHO1-Gens bei 29 von 30 aus Patientenmaterial isolierten *C. albicans* Stämmen mittels PCR und Agarosegelelektrophorese bewiesen. Erstmals wurde das RHO1-Gen auch bei weiteren *Candida*-Spezies: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. lusitaniae* nachgewiesen. Darüber hinaus ist es gelungen, mittels einer Restriktionsanalyse des amplifizierten RHO1-Gens unter Verwendung der Enzyme BseNI, RsaI, VspI, HpaII und Cfr10I Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) bei diesen Spezies nachzuweisen. Eine Sequenzanalyse der untersuchten Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. tropicalis* ATCC 201381 und *C. lusitaniae* DSM 70102 im Vergleich zur publizierten RHO1-Sequenz von *C. albicans* (GenBank Nr. D86430) bestätigte die experimentellen Ergebnisse. Als Ursache für die unterschiedlichen RFLP fanden sich Abweichungen in der Nukleotidsequenz, die zu Verschiebungen oder auch zum Fehlen der Enzymschnittstellen geführt haben. Dennoch bestätigte die Sequenzanalyse, dass es sich bei dem RHO1-Gen der Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. tropicalis* ATCC 201381 und *C. lusitaniae* DSM 70102 um Homologe des RHO1-Gens von *C. albicans* handelt.

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur weiteren Erforschung der Bedeutung des RHO1-Gens sowohl an sich, als auch für dessen Bedeutung im medizinischen Alltag geleistet werden.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
As	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATCC	American Type Culture Collection
AV	Ausgangsvolumen
bp	Basenpaare
C.	<i>Candida</i>
CFU	colony forming units
d. h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP-	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EB	Tris-Cl, Elutionspuffer (QIAGEN)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency/Europäische Arzneimittelagentur
et al.	et alii, und andere
FDA	Food and Drug Administration
GAP	GTPase activating proteins (GTPase aktivierende Proteine)
GDI	GDP dissociation inhibitor (GDP-Dissoziations-Inhibitor)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-GDP-exchange factor (GTP-GDP-Austauschfaktoren)
G-Proteine	Guaninnukleotid- bindende Proteine

GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP spaltendes Enzym
GTPyS	Guanosine 5`-O- (thiophosphate)
h	Stunden
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSCT	Human Stem Cell Transplantation
HUSAR	Heidelberg Unix Sequenze Analysis Resources
IgG	Immunglobulin G
ITS	Intensivstation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIC	Minimale Inhibitorische Konzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol(ar)
NaCl	Natriumchlorid
NICU	neonatal intensive care unit
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
o. g.	oben genannte
OD	Optische Dichte
PB	Bindungspuffer (QIAGEN)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Waschpuffer (QIAGEN)
PK	Positivkontrolle
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pikomol
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Rho1p	Rho 1 - Protein
rpm	rotation per minute, Umdrehungen pro Minute
RPS	repetitive Sequenzen
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
s	Sekunden
S.	<i>Saccharomyces</i>
S.	Seite
s.	siehe
SAP	sekretorische Aspartatproteinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
U	Unit
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
VLBW	very low birth weight (sehr niedriges Geburtsgewicht)
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Beziehung zwischen den Hauptkomponenten der Zellwand bei <i>S. cerevisiae</i>	11
Abb. 1-2: RHO-GTPase Zyklus [Abb. aus 199].....	17
Abb. 3-1: Elektropherogramm amplifizierter <i>C. albicans</i> -DNA mit den Primerpaaren canrho1-5f/canrho1-3r und grl5/grl3.rev.....	42
Abb. 3-2: Elektropherogramm des unter verschiedenen PCR-Bedingungen amplifizierten RHO1-Gens zweier <i>C. albicans</i> -Stämme	43
Abb. 3-3: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des <i>C. albicans</i> Stammes B10433 nach „klassischer“ DNA-Präparationsmethode in verschiedenen Konzentrationen.....	46
Abb. 3-4: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des <i>C. albicans</i> Stammes B10433 zum Vergleich der „schnellen“ und „klassischen“ DNA-Präparationsmethode in verschiedenen Konzentrationen	47
Abb. 3-5: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des <i>C. albicans</i> Stammes B10433 in ausgewählten Verdünnungsstufen zur Ermittlung der PCR-Nachweisgrenze	49
Abb. 3-6: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der <i>C. albicans</i> Stämme 5466 und 5554 in ausgewählten Konzentrationen zur Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration für die PCR	51
Abb. 3-7: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der <i>C. albicans</i> Stämme S 137, 5535, 5442 und 5423	52
Abb. 3-8: Elektropherogramm: Kein Nachweis des RHO1-Gens bei dem <i>C. albicans</i> Stamm S 130	52
Abb. 3-9: Elektropherogramm amplifizierter DNA des <i>C. albicans</i> Stammes S 130 mit dem Primerpaar 153/154 und erneut keine Amplifizierung des RHO1-Gens dieses Stammes.....	53
Abb. 3-10: Schematische Darstellung der zu erwartenden Schnittmuster nach Restriktion des RHO1-Gens mit den fünf ausgewählten Restriktionsendonukleasen BseNI, Cfr10I, HpaII, RsaI und VspI.....	55
Abb. 3-11: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des <i>C. albicans</i> Stammes 5554 nach Restriktion mit Cfr10I und BseNI bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.....	56
Abb. 3-12: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der <i>C. albicans</i> Stämme 5495 und 5553 nach Restriktion mit den fünf ausgewählten Enzymen.....	57

-
- Abb. 3-13: Elektropherogramm nach PCR der Stämme *C. guilliermondii* DSM 6381, *C. norvegensis* DSM 70760, *C. sake* DSM 70763 und *C. lusitaniae* DSM 70102 mit dem Primerpaar 1/2 zum Nachweis des RHO1-Gens59
- Abb. 3-14: Elektropherogramm nach PCR mit dem Primerpaar 1/2 zur Amplifizierung des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida* Spezies und *Trichosporon mucoide*60
- Abb. 3-15: Elektropherogramm nach erneuter Reinigung der DNA und Wiederholung der PCR mit dem Primerpaar 1/2 zur Amplifizierung des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida*-Spezies und *Trichosporon mucoide*61
- Abb. 3-16: Elektropherogramm amplifizierter DNA nach PCR mit dem Primerpaar 1/2 bei verschiedenen *Candida*-Spezies und *Trichosporon mucoide* - Nachweis einer RHO1-ähnlichen Bande bei drei *Candida*-Spezies62
- Abb. 3-17: Elektropherogramm amplifizierter DNA verschiedener *Candida*-Spezies und *Trichosporon mucoide* nach PCR mit dem Primerpaar 153/15463
- Abb. 3-18: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens bei verschiedenen Stämmen der Spezies: *C.lusitaniae* und *C.parapsilosis*.....65
- Abb. 3-19: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens bei verschiedenen Stämmen der Spezies: *C.tropicalis*65
- Abb. 3-20: Elektropherogramm amplifizierter DNA des Stammes *C. tropicalis* S14 mit den Primerpaaren 1/2 und 153/154.....66
- Abb. 3-21: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens des Stammes *C. lusitaniae* DSM 70102 nach Restriktion68
- Abb. 3-22: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion.....69
- Abb. 3-23: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit VspI.....69
- Abb. 3-24: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5554, *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit HpAI.....70
- Abb. 3-25: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5554, *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit Cfr10I.....71
- Abb. 3-26: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme *C. albicans* 5495, *C. lusitaniae* DSM 70102, *C. parapsilosis* ATCC 90018 und *C. tropicalis* 201381 nach Restriktion mit RsAI.....72

Abb. 3-27: Elektropherogramm des amplifizierten RHO1-Gens der Stämme <i>C. albicans</i> 5495, <i>C. lusitaniae</i> DSM 70102, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 und <i>C. tropicalis</i> 201381 nach Restriktion mit BseNI.....	73
Abb. 3-28: Konsensussequenzen von <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018, <i>C. tropicalis</i> ATCC 201381, <i>C. lusitaniae</i> DSM 70102 im Vergleich zur RHO1-Sequenz von <i>C. albicans</i>	75
Abb. 3-29: bearbeitete Konsensussequenzen von <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018, <i>C. tropicalis</i> ATCC 201381, <i>C. lusitaniae</i> DSM 70102 im Vergleich zur RHO1-Sequenz von <i>C. albicans</i>	77
Abb. 3-30: Aminosäuresequenzen von <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018, <i>C. tropicalis</i> ATCC 201381, <i>C. lusitaniae</i> DSM 70102 im Vergleich zur RHO1-Sequenz von <i>C. albicans</i>	78
Abb. 4-1: Markierung der konservierten Domänen bei Rho-Typ GTPasen (G1, G2, G3, G4 und geranylgeranylation site) bei <i>C. lusitaniae</i> DSM 70102, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018, <i>C. tropicalis</i> ATCC 201381 und <i>C. albicans</i> [GenBank Nr. D86430].....	104
Abb. 4-2: MAP von <i>C. albicans</i> RHO1, [Genbank-Nr.: D86430].....	107
Abb. 4-3: MAP des RHO1-Gens von <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	109
Abb. 4-4: MAP des RHO1-Gens von <i>C. tropicalis</i> ATCC 201381	110
Abb. 4-5: MAP des RHO1-Gens von <i>C. lusitaniae</i> DSM 70102	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Pilzstämmе	23
Tab. 2-2: Geräte	24
Tab. 2-3: Chemikalien und Lösungen	25
Tab. 2-4: Enzyme, Puffer und Reagenzien	26
Tab. 2-5: Oligonukleotide.....	27
Tab. 2-6: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	27
Tab. 2-7: Weitere Verbrauchsmaterialien	27
Tab. 2-8: <i>Candida albicans</i> Stämme	28
Tab. 2-9: Weitere <i>Candida</i> -Spezies	30
Tab. 2-10: PCR-Ansatz.....	34
Tab. 2-11: Reaktionsbedingungen für die PCR	35
Tab. 2-12: DNA-Farblösung für Gelelektrophorese	38
Tab. 3-1: Konzentrationsbestimmung (Keimzahl/ml) mit verschiedenen Methoden.....	44
Tab. 3-2: Verdünnungsreihe I <i>C. albicans</i> B 10433	48
Tab. 3-3: Verdünnungsreihe II <i>C.albicans</i> B 10433	48
Tab. 3-4: Verdünnungsreihe <i>C.albicans</i> 5466 und 5554.....	50
Tab. 3-5: Restriktionsendonukleasen.....	55
Tab. 3-6: DNA-Konzentrationen weiterer <i>Candida</i> -Spezies.....	61
Tab. 3-7: Veränderungen in der As-Sequenz bei <i>C.parapsilosis</i> ATCC 90018.....	79
Tab. 3-8: Veränderungen in der As-Sequenz bei <i>C. tropicalis</i> ATCC 201381	80
Tab. 3-9: Veränderungen der As-Sequenz infolge Nukleotidaustausch.....	86

Literaturverzeichnis

- 1 www.aerztezeitung.de; 27.11.2006
- 2 www.genome.dkfz-heidelberg.de
- 3 www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/candidas/candidas.htm
- 4 **Abi-Said D., Anaissie E., Uzun O., Raad I., Pinzcowski H., Vartivarian S.;** The Epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* 24: 1122-1128; 1997.
- 5 **Arathoon E.G., Gotuzzo E., Noriega L.M., Berman R.S., DiNubile M.J., Sable C.A.;** Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (2): 451-457; 2002.
- 6 **Arellano M., Duran A., Perez P.;** Rho1 GTPase activates the (1-3) β -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *The EMBO Journal* 15 (17): 4584-4591; 1996.
- 7 **Argimón S., Galello F., Pereyra E., Rossi S., Moreno S.;** *Mucor rouxii* Rho1 protein; characterization and possible role in polarized growth. *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 237-251; 2007.
- 8 **Aspenström P., Fransson A., Saras J.;** Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem. J.* 377: 327-337; 2004.
- 9 **Bachmann S.P., Patterson T.F., Lopez-Ribot J.L.;** In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (6): 2228-2230; 2002.
- 10 **Bader M. S., Lai S. M., Kumar V., Hinthorn D.;** Candidemia in patients with diabetes mellitus: Epidemiology and Predictors of Mortality. *Scand. J. Infect. Dis.* 36: 860-864; 2004.
- 11 **Baixench M.-T., Aoun N., Desnos-Ollivier M., Garcia-Hermoso D., Bretagne S., Ramires S., Piketty C., Dannaoui E.;** Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1076-1083; 2007.
- 12 **Balashov S. V., Park S., Perlin D. S.;** Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (6): 2058-2063; 2006.

- 13 **Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C., Weisburg W.G.;** Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of Bacteriology* 173 (7): 2250-2255; 1991.
- 14 **Beauvais A., Bruneau J.M., Buitrago M.J., Legrand R., Latge J.P.;** Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology* 183 (7): 2273-2279; 2001.
- 15 **Becker W.K., Cioffi W.G., McManus A.T., Kim S.H., McManus W.F., Mason A.D., Pruitt B.A.;** Fungal burn wound infection. *Arch Surgery* 126: 44-48; 1991.
- 16 **Bedini A., Venturelli C., Guaraldi G., Codeluppi M., Borghi V., Rumpianesi F., Barchiesi F., Esposito R.;** Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 75-80; 2006.
- 17 **Belazi M., Velegraki A., Fleva A., Gidarakou I., Papanau L., Baka D., Daniilidou N., Karamitsos D.;** Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 48: 192-196; 2005.
- 18 **Benjamin Jr. D.K., Driscoll T., Seibel N.L., Gonzalez C.E., Roden M.M., Kilaru R., Clark K., Dowell J.A., Schranz J., Walsh T.J.;** Safety and pharmacokinetics of intravenous anidulafungin in children with neutropenia at high risk for invasive fungal infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 50 (2): 632-638; 2006.
- 19 **Bibashi E., Memmos D., Kokolina E., Tsakiris D., Sofianou D., Papadimitriou M.;** Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during an 11-year period: report of 46 cases. *Clinical Infectious Diseases* 36: 927-31; 2003.
- 20 **Blaschke-Hellmessen ;** Standorte für *Candida* aus medizinisch-hygienischer Sicht. *Mycoses* 42 (Suppl. 1): 22-29; 1999.
- 21 **Blot S.I., Vandewoude K.H., De Waele J.J.;** *Candida* peritonitis. *Current Opinion in Critical Care* 13: 195-199; 2007.
- 22 **Borg-von Zepelin M., Monod M.;** Fungale Pathogene. *Pharm. Unserer Zeit* 2: 110-116; 2003.
- 23 **Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F.;** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127; 1991.
- 24 **Bow E.J., Loewen R., Cheang M.S.;** Invasive fungal disease in adults undergoing remission-induction therapy for acute myeloid leukemia: the pathogenic role of the antileukemic regimen. *Clinical Infectious Diseases* 21: 361-369; 1995.
- 25 **Burnie J.P., Odds F.C., Lee W., Webster C., Williams J.D.;** Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. *British Medical Journal* 290: 746-748; 1985.

-
- 26 **Cabib E., Drgon T., Drogonova J., Ford R.A., Kollar R.;** The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochemical Society Transactions* 25: 200-204; 1997.
- 27 **Cabib E., Drogonova J., Drgon T.;** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 307-333; 1998.
- 28 **Calandra T., Bille J., Schneider R., Mosimann F., Francioli P.;** Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients. *The Lancet* 16: 1437-1440; 1989.
- 29 **Calderone R.A., Fonzi W.A.;** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9 (7): 327-335; 2001.
- 30 **Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Tanabe K., Niimi M., Monk B.C.;** *Candida albicans* drug resistance - another way to cope with stress. *Microbiology* 153: 3211-3217; 2007.
- 31 **Cappelletty D., Eiselstein-McKitrick K.;** The Echinocandins. *Pharmacotherapy* 27 (3): 369-388; 2007.
- 32 **Carvalho A., Costa-De-Oliveira S., Martins M. L., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G., Ludovico P., Rodrigues F.;** Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med. Mycol.* 45 (7): 619-27; 2007.
- 33 **Chardin P., Madaule P., Tavitian A.;** Coding sequence of human rho cDNAs clone 6 and clone 9. *Nucl. Acids Res.* 16: 2717; 1988.
- 34 **Cheng M.-F., Yang Y.-L., Yao T.-J., Lin C.-L., Liu J.-S., Tang R.-B., Yu K.-W., Fan Y.-H., Hsieh K.-S., Ho M., Lo H.-J.;** Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. *BMC Infectious Diseases* 5 (1): 22; 2005.
- 35 **Costa-de-Oliveira S., Pina-Vaz C., Mendonca D., Goncalves Rodrigues A.;** A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (5): 365-374; 2008.
- 36 **Cutler J.E.;** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annual Reviews* 45: 187-218; 1991.
- 37 **Dannaoui E., Lortholary O., Raoux D., Bougnoux M. E., Galeazzi G., Lawrence C., Moissenet D., Poilane I., Hoinard D., Dromer F., and the YEASTS Group;** Comparative in vitro activities of caspofungin and micafungin, determined using the method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, against yeast isolates obtained in France 2005-2006. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (2): 778-781; 2008.
- 38 **De Melo L.D.B., Eisele N., Nepomuceno-Silva J.L., Lopes U.G.;** TcRho1, the *Trypanosoma cruzi* Rho homologue, regulates cell-adhesion properties: Evidence for a conserved function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 617-622; 2006.

-
- 39 **Diekema D.J., Messer S.A., Hollis R.J., Wenzel R.P., Pfaller M.A.;** An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 147-153; 1997.
- 40 **Diezmann S., Cox C.J., Schönian G., Vilgalys R.J., Mitchell T.G.;** Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (12): 5624-5635; 2004.
- 41 **Dojnov B., Bozic N., Bulajic N., Vujcic Z.;** Preparation of combined extract of cell wall and cytosol antigens of *Candida albicans* for immunoblot analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 21: 406-412; 2007.
- 42 **Douglas C.M.;** Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Medical Mycology* 39, Supplement I: 55-66; 2001.
- 43 **Douglas C.M., DiIppolito J.A., Shei G.J., Meinz M., Onishi J., Marrinan J.A., Li W., Abruzzo G.K., Flattery A., Bartizal K., Mitchell A., Kurtz M.B.;** Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 41 (11): 2471-2479; 1997.
- 44 **Douglas C.M., Foor F., Marrinan J.A., Morin N., Nielsen J.B., Dahl A.M., Mazur P., Baginsky W., El-Sherbeini M., Clemas J.A., Mandala S.M., Frommer B.R., Kurtz M.B.;** The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membran protein which is a subunit of 1,3- β -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12907-12911; 1994.
- 45 **Drgonova J., Drgon T., Tanaka K., Koller R., Chen G.-C., Ford R.A., Chan C.S.M., Takai Y., Cabib E.;** Rho 1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* 272: 277-279; 1996.
- 46 **Drogonova J., Drogon T., Roh D.-H., Cabib E.;** The GTP binding protein Rho 1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *The Journal of Cell Biology* 146 (2): 373-387; 1999.
- 47 **Dunyach C., Bertout S., Phelipeau C., Drakulovski P., Reynes J., Malliè M.;** Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60: 263-271; 2008.
- 48 **Edlind T.D., Katiyar S.K.;** The echinocandin "target" identified by cross-linking is a homolog of Pil1 and Lsp1, sphingolipid-dependent regulators of cell wall integrity signaling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (11): 4491; 2004.
- 49 **Eggimann, P., Garbino J., Pittet, D.;** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 685-702; 2003.

-
- 50 **Einsele H., Hebart H., Roller G., Löffler J., Rothenhöfer I., Müller C.A., Bowden R.A., van Burik J.-A., Engelhard D., Kanz L., Schumacher U.;** Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (6): 1353-1360; 1997.
- 51 **Ernst J.F.;** Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* 146: 1763-1774; 2000.
- 52 **ESPED-Studie;** Systemische Infektionen durch Pilze bei Früh- und Neugeborenen (01.01.1998-31.12.1999). Jahresbericht 1999; 1999.
- 53 **Etienne-Manneville S., Hall A.;** Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635; 2002.
- 54 **Falkensammer B., Pleyer L., Ressler S., Berg A., Borg-von Zepelin M., Nagl M., Lass-Flörl C., Speth C., Dierich M.P., Würzner R.;** Basidiomycete metabolites attenuate virulence properties of *Candida albicans* in vitro. *Mycoses* 16: 2008 [Epub ahead of print].
- 55 **Filioti J., Spiroglou K., Roilides E.;** Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. *Intensive Care Med.* 33: 1272-1283; 2007.
- 56 **Fischer L., Sterneck M.;** Invasive Pilzinfektionen bei Patienten nach Lebertransplantation. *Mycoses* 48 (Suppl.1): 27-35; 2005.
- 57 **Fitch P.G., Gammie A.E., Lee D.J., Brizzio de Candal V., Rose M.D.;** Lrg1p is a Rho1 GTPase-activating protein required for efficient cell fusion in yeast. *Genetics* 168: 733-746; 2004.
- 58 **Fridkin S.K., Jarvis W.R.;** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 9 (4): 499-511; 1996.
- 59 **Fujiwara T., Tanaka K., Inoue E., Kikyo M., Takai Y.;** Bni1p regulates microtubule-dependent nuclear migration through the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8016-8027; 1999.
- 60 **Garcia-Effron G., Katiyar S.K., Park S., Edlind T., Perlin D.S.;** A naturally occurring Fks1p proline-to-alanine amino acid change in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (7): 2305-12; 2008.
- 61 **Garcia-San Miguel L., Cobo J., Martos I., Otheo E., Muriel A., Pintado V., Moreno S.;** Risk factors for candidemia in pediatric patients with congenital heart disease. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 27 (6): 576-580; 2006.
- 62 **Garzoni C., Nobre V.A., Garbino J.;** *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 915-926; 2007.

-
- 63 **Gassen H.G., Sachse G.E., Schulte A.;** PCR Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Stuttgart, Gustav Fischer; 1994.
- 64 **Georgopapadakou N.H.;** Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 547-557; 1998.
- 65 **Georgopapadakou N.H., Tkacz J.S.;** The fungal cell wall as a drug target. *Trends in microbiology* 3: 98-104; 1995.
- 66 **Ghannoum M.A.;** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (1): 122-143; 2000.
- 67 **Ghannoum M.A., Rice L.B.;** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 501-517; 1999.
- 68 **Giamarellou H., Antoniadou A.;** Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 17 (8): 558-564; 1996.
- 69 **Gozalbo D., Roig P., Villamon E., Gil M.L.;** *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential target for antifungal therapy. *Current Drug Targets* 4 (2): 117-135; 2004.
- 70 **Graf B., Trost A., Eucker J., Göbel U.B., Adam T.;** Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48: 149-151; 2004.
- 71 **Groll A.H., Attarbaschi A., Schuster F.R., Herzog N., Grigull L., Dworzak M.N., Beutel K., Laws H.-J., Lehrnbecher T.;** Treatment with caspofungin in immunocompromised pediatric patients: a multicentre survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 527-535; 2006.
- 72 **Guarro J., Gene J., Stchigel A.M.;** Developments in fungal taxonomie. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (3): 454-500; 1999.
- 73 **Guiver M., Levi K., Oppenheim B.A.;** Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J. Clin. Pathol.* 54: 362-366; 2001.
- 74 **Hacker J.;** Molekulare Infektionsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin; 240-244; 2000.
- 75 **Hajjeh R.A., Sofair A.N., Harrison L.H., Lyon G.M., Arthington-Skaggs B.A., Mirza S.A., Phelan M., Morgan J., Lee-Yang W., Ciblak M.A., Benjamin L.E., Thomzon Sanza L., Huie S., Fah Yeo S., Brandt M.E., Warnock D.W.;** Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (4): 1519-1527; 2004.

-
- 76 **Hall A.**; Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10: 31-54; 1994.
- 77 **Hall A.**; Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514; 1998.
- 78 **Herbrecht R., Denning D.W., Patterson T.F., Bennett J.E., Greene R.E., Oestmann J.-W., Kern W.V., Marr K.A., Ribaud P., Lortholary O., Sylvester R., Rubin R.H., Wingard J.R., Stark P., Durand C., Caillot D., Thiel E., Chandrasekar P.H., Hodges M.R., Schlamm H.T., Troke P.F., De Pauw B.**; Voriconazole versus amphotericin B for the primary therapy of invasive aspergillosis. *The New England Journal of Medicine* 347 (8): 408-415; 2002.
- 79 **Hernandez S., Lopez-Ribot J.L., Najvar L.K., MaCarthy D. I., Bocanegra R., Graybill J.R.**; Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (4): 1382-1383; 2004.
- 80 **Hof H.**; Developments in the epidemiology of invasive fungal infections - implications for the empiric and targeted antifungal therapy. *Mycoses* 51 (Suppl. 1): 1-6; 2008.
- 81 **Hof H.**; Hefe ist nicht gleich Hefe. *Mycoses* 46: 245-286; 2003.
- 82 **Hof H., Dörris R., Müller R.L.**; Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart; 2000.
- 83 **Hof H., Groll A.**; Neue Antimykotika, Stellenwert von Caspofungin, einem neuen Antimykotikum aus der Gruppe der Echinocandine, bei der Therapie von invasiven Mykosen. *Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft e.V. , Mykologie Forum, Ausgabe 1: 22-28; 2003.*
- 84 **Holzheimer R.G., Dralle H.**; Management of mycoses in surgical patients - review of the literature. *European Journal of Medical Research* 7 (5): 200-226; 2002.
- 85 **Hoyer L.L.**; The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9 (4): 176-180; 2001.
- 86 **Hube H., Sanglard D., Odds F.C., Hess D., Monod M., Schäfer W., Brown A.J.P., Gow N.A.R.**; Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infection and Immunity* 65 (9): 3529-3538; 1997.
- 87 **Hung C.-C., Yang Y.-L., Lauderdale T.-L., McDonald L.C., Hsiao C.-F., Cheng H.-H., Ho Y. A., Lo H.-J.**; Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (4): 1600-1603; 2005.
- 88 **Inácio J., Flores O., Spencer-Martins I.**; Efficient identification of clinically relevant *Candida* yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with hybridization to species-specific oligonucleotide probes. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (2): 713-720; 2008.

-
- 89 **Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.;** PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc.; 1990.
- 90 **Inoue S.B., Quadota H., Arisawa M., Watanabe T., Ohya Y.;** Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1,3- β -glucan synthase. *The Journal Of Biological Chemistry* 274 (53): 38119-38124; 1999.
- 91 **Inoue S.B., Takewaki N., Takasuka T., Mio T., Adachi M., Fuji Y., Miyamoto C., Arisawa M., Furuichi Y., Watanabe T.;** Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 231: 845-854; 1995.
- 92 **Ishihara S., Hirata A., Nogami S., Beauvais A., Latge J.-P., Ohya Y.;** Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 6 (2): 143-156; 2007.
- 93 **Jaffe A.B., Hall A.;** Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 247-269; 2005.
- 94 **Jordà-Marcos R., Álvarez-Lerma F., Jurado F., Palomar M., Nolla-Salas J., Leòn M. A., Leòn C. and the EPCAN Study Group;** Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* 50: 302-310; 2007.
- 95 **Kamada Y., Quadota H., Python C.P., Anrakus Y., Ohya Y., Levin D.E.;** Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *The Journal Of Biological Chemistry* 271 (16): 9193-9196; 1996.
- 96 **Kanbe T., Kurimoto K., Hattori H., Iwata T., Kikuchi A.;** Rapid identification of *Candida albicans* and its related species *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* by a single PCR amplification using primers specific for the repetitive sequence (RPS) of *Candida albicans*. *Journal of Dermatological Science* 40: 43-50; 2005.
- 97 **Kao A.S., Brandt M.E., Pruitt W.R., Conn L.A., Perjins B.A., Stephens D.S., Baughman W.S., Reingold A.L., Rothrock G.A., Pfaller M.A., Pinner R.W., Hajjeh R.A.;** The epidemiology of candidemia in two united states cities: results of a population-based active surveillance. *Clinical Infectious Diseases* 29: 1164-1170; 1999.
- 98 **Karahan Z.C., Akar N.;** Subtypes of genotype A *Candida albicans* isolates determined by restriction endonuclease and sequence analyses. *Microbiol. Res.* 160 (4): 361-366; 2005.
- 99 **Katiyar S., Pfaller M., Edlind T.;** *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2892-2894; 2006.

- 100 **Kauffmann C.A.**; Clinical efficacy of new antifungal agents. *Current Opinion in Microbiology* 9: 483-488; 2006.
- 101 **Kedzierska A., Kochan P., Pietrzyk A., Kedzierska J.**; Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1->3)- β -D-glucan antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 755-766; 2007.
- 102 **Kelly R., Card D., Register E., Mazur P., Kelly T., Tanaka K.-I., Onishi J., Williamson J.M., Fan H., Satoh T., Kurtz M.**; Geranylgeranyltransferase I of *Candida albicans*: null mutants or enzyme inhibitors produce unexpected phenotypes. *Journal Of Bacteriology* 182 (3): 704-713; 2000.
- 103 **Kikuchi Y., Mizuuchi E., Nogami S., Morishita S., Ohya Y.**; Involvement of Rho-type GTPase in control of cell size in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 7: 569-578; 2007.
- 104 **Klingspor L., Jalal S.**; Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (8): 745-753; 2006.
- 105 **Klis F.M.**; Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10 (7): 851-869; 1994.
- 106 **Koch G., Tanaka K., Masuda T., Yamochi W., Nonaka H., Takai Y.**; Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* 15: 417-422; 1997.
- 107 **Koh A.Y., Köhler J.R., Coggs K.T., Van Rooijen N., Pier G.B.**; Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathogens* 4 (2): e35; 2008.
- 108 **Kohno H., Tanaka K., Mino A. Umikawa M., Imamura H., Fujiwara T., Fujita Y., Hotta K., Quadota H., Watanabe T., Ohya Y., Takai Y.**; Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 15 (22): 6060-6068; 1996.
- 109 **Kondoh O., Tachibana Y., Ohya Y., Arisawa M., Watanabe T.**; Cloning of the RHO 1 gene from *Candida albicans* and its regulation of the beta-1,3-glucan synthesis. *Journal of Bacteriology* 179 (24): 7734-7741; 1997.
- 110 **Kossoff E.H., Buescher E.S., Karlowicz M.G.**; Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 17 (6): 504-508; 1998.
- 111 **Krause S.D., Reinhardt J., Vazquez J.A., Reboli A., Goldstein B.P., Wible M., Henkel T.**; Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (6): 2021-2024; 2004.
- 112 **Krcmery V., Barnest A.J.**; Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* 50: 243-260; 2002.

-
- 113 **Krogh-Madsen M., Arendrup M.C., Heslet L., Knudsen J.D.**; Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. Clin. Inf. Dis. 42 (7): 938-944; 2006.
- 114 **Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.**; Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 1773-1780; 2002.
- 115 **Kullberg B.J., Oude Lashof A.M.L.**; Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. European Journal of Medical Research 7 (5): 183-191; 2002.
- 116 **Kurtz M.B., Douglas C.M.**; Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. Journal of Medical and Veterinary Mycology 35: 79-86; 1997.
- 117 **Kurtzmann C.P., Fell J.W. (eds)**; The Yeasts, A Taxonomic Study. Fourth Edition; Elsevier Science B.V., Amsterdam, Niederlande; 1998.
- 118 **Kurzai O., Heinz W.J., Mühlischlegel F.**; ASM-Conference "*Candida* and Candidiasis". March 1-4, 1999. Charleston SC, USA. Mycoses 42: 427-430; 1999.
- 119 **Lagrou K., Verhaegen J., Peetermans W. E., De Rijdt T., Maertens J., Van Wijngaerden E.**; Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative agents. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26: 541-547; 2007.
- 120 **Lain A., Elguezabal N., Amutio E., de Larrinoa I.F., Moragues M.D., Pontòn J.**; Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. Clinical and Developmental Immunology 2008: 721950; 2008.
- 121 **Latgé J.-P.**; The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Molecular Microbiology 66 (2): 279-290; 2007.
- 122 **Laverdière M., Lalonde R. G., Baril J.-G., Sheppard D.C., Park S., Perlin D.S.**; Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57: 705-708; 2006.
- 123 **Lehrnbecher T., Groll A.H.**; Experiences with the use of caspofungin in pediatric patients. Mycoses 51 (Suppl. 1): 58-64; 2008.
- 124 **Leibovitz E.**; Neonatal candidosis: clinical picture, management controversies and consensus, and new therapeutic options. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49 (Suppl. S1): 69-73; 2002.
- 125 **Lesage G., Bussey H.**; Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70 (2): 317-343; 2006.

-
- 126 **Levin D.E.**; Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (2): 262-291; 2005.
- 127 **Levy I., Shalit I., Sirota L., Ashkenazi S., German B., Linder N.**; *Candida* endocarditis in neonates: report of five cases and review of the literature. *Mycoses* 49: 43-48; 2006.
- 128 **Lipke P.N., Ovale R.**; Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology* 180 (15): 3735-3740; 1998.
- 129 **Lipp H.-P.**; Antifungal agents - clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Mycoses* 51 (Suppl. 1): 7-18; 2008.
- 130 **Lipsett P. A.**; Surgical critical care: fungal infections in surgical patients. *Crit. Care Med.* 34 (9) (Suppl.): S215-S224; 2006.
- 131 **Lo H.-J., Köhler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R.**; Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949; 1997.
- 132 **Loeffler J., Hebart H., Magga S., Schmidt D., Klingspor L., Tollemar J., Schumacher U., Einsele H.**; Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridisation. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 38 (4): 207-212; 2000.
- 133 **Löffler J., Stevens D.A.**; Antifungal drug resistance. *Clinical Infectious Diseases* 36 (Suppl. 1): S31-41; 2003.
- 134 **Lugert R., Schettler C., Gross U.**; Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. *Mycoses* 49: 298-304; 2006.
- 135 **Mackay D.J.G., Hall A.**; Rho GTPases. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (33): 20685-20688; 1998.
- 136 **Madaule P., Axel R.**; A novel ras-related gene family. *Cell* 41: 31-40; 1985.
- 137 **Madaule P., Axel R., Myers A.M.**; Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 779-783; 1987.
- 138 **Maertens J., Vreboos M., Boogaerts M.**; Assessing risk factors for systemic fungal infections. *European Journal of Cancer Care* 10: 56-62; 2001.
- 139 **Manzoni P., Farina D., Leonessa M., Antonielli d'Oulx E., Galletto P., Mostert M., Miniero R., Gomirato G.**; Risk factors for progression to invasive fungal infection in preterm neonates with fungal colonization. *Pediatrics* 118: 2359-2364; 2006.
- 140 **Margulis L., Schwartz K.V.**; KINGDOM FUNGI; FIVE KINGDOMS An illustrated Guide to the Phyla on Earth. S. 345-368; 3. New York, W.H. Freeman and Company, 1998.

-
- 141 **Martin G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M.**; The epidemiology of sepsis in the united states from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348: 1546-1554; 2003.
- 142 **Maschmeyer G.**; The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27S: S3-S6; 2006.
- 143 Maschmeyer G., Ruhnke M.; Update on antifungal treatment of invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. *Mycoses* 47: 263-276; 2004.
- 144 **Mazur P., Baginsky W.**; In vitro activity of 1,3- β -D-glucan synthase requires the GTP-binding Protein Rho1. *J. of Biol. Chem.* 271: 14604-14609; 1996.
- 145 **Mazur P., Morin N., Baginsky W., El-Sherbeini M., Clemas J.A., Nielsen J.B., Foor F.**; Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. *Molecular and Cellular Biology* 15 (10): 5671-5681; 1995.
- 146 **Merlin E., Galambrun C., Ribaud P., Blanc T., Michel G., Auvrignon A., Stephan J.-L.**; Efficacy and safety of caspofungin therapy in children with invasive fungal infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 25 (12): 1186-1188; 2006.
- 147 **Metwally L., Fairley D.J., Coyle P.V., Hay R.J., Hedderwick S., McCloskey B., O'Neill H. J., Webb C.H., Elbaz W., McMullan R.**; Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology* 57: 296-303; 2008.
- 148 **Minari A., Hachem R., Raad I.**; *Candida lusitanae*: a cause of breakthrough fungemia in cancer patients. *Clinical Infectious Diseases* 32: 186-190; 2001.
- 149 **Mirhendi H., Makimura K., Khoramizadeh M., Yamaguchi H.**; A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn. J. Med. Mycol.* 47: 225-229; 2006.
- 150 **Mishra N. N., Prasad T., Sharma N., Payasi A., Prasad R., Gupta D. K., Singh R.**; Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54 (3): 201-235; 2007.
- 151 **Mora-Duarte J., Betts R., Rotstein C., Lopes Colombo A., Thompson-Moya L., Smietana J., Lupinacci R., Sable C., Kartsonis N., Perfect J.**; Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine* 347 (25): 2020-2029; 2002.
- 152 **Morschhäuser J.**; Wie "entkommen" Pilze der Therapie? Resistenzen und Resistenzmechanismen. *Pharm. Unserer Zeit* 2: 124-128; 2003.
- 153 **Morschhäuser J.**; The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587: 240-248; 2002.

-
- 154 **Moudgal V., Little T., Boikov D., Vazquez J.A.**; Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (2): 767-769; 2005.
- 155 **Mousa H.A.-L., Al-Bader S.M.**; Yeast infection of burns. *Mycoses* 44: 147-149; 2001.
- 156 **Müller F.-M.C., Morschhäuser J., Köhler G., Oelschläger T.A., Ziebuhr W., Hacker J.**; Adhärenz und Invasion: Zwei Pathogenitätsfaktoren bei pathogenen Bakterien und Pilzen. *Mycoses* 42, Suppl. 1: 39-42; 1999.
- 157 **Naglik J. R., Fostira F., Ruprai J., Staab J.F., Challacombe S.J., Sundstrom P.**; *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1323-1327; 2006.
- 158 **Naglik J., Albrecht A., Bader O., Hube B.**; *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6 (10): 915-926; 2004.
- 159 **Nakano K., Arai R., Mabuchi I.**; The small GTP-binding protein Rho 1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity and septum formation in the fission yeast *Saccharomyces pombe*. *Genes to Cells* 2: 679-694; 1997.
- 160 **Navarro-Garcia F., Sanchez M., Nombela C., Pla J.**; Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 245-268; 2001.
- 161 **Nepomuceno-Silva J.L., Yokoyama K., de Mello L.D.B., Mendoca S.M., Paixao J.C., Baron R., Faye J.-C., Buckner F.S., Van Voorhis W.C., Gelb M.H., Lopes U.G.**; TcRho1, a farnesylated Rho family homologue from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal Of Biological Chemistry* 276 (32): 29711-29718; 2001.
- 162 **Newton C.R., Graham A.**; PCR. 2. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford; Spektrum; 1994.
- 163 **Nonaka H., Tanaka K., Hirano H., Fujiwara T., Kohno H., Umikawa M., Mino A., Takai Y.**; A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 14 (23): 5931-5938; 1995.
- 164 **Odds F.C.**; *Candida* and Candidosis. 2.ed., London; Balliere Tindall; 1988.
- 165 **Odds F.C.**; *Candida* infections: an overview. *Critical Reviews in Microbiology* 15 (1): 1-5; 1987.
- 166 **Odds F.C.**; Pathogenesis of *Candida* infections. *Journal of the American Academy of Dermatology* 31: S2-S5; 1994.
- 167 **Ohmit S.E., Sobel J.D., Schumann P., Duerr A., Mayer K., Rompalo A., Klein R.S.**; Longitudinal study of mucosal *Candida* species colonisation and candidiasis among Human

- Immunodeficiency Virus (HIV)- seropositive and at-risk HIV-seronegative woman. *The Journal of Infectious Diseases* 188: 118-127; 2003.
- 168 **Olson M.F., Ashworth A., Hall A.**; An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269: 1270-1272; 1995.
- 169 **Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y., Takai Y.**; Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 15 (9): 2169-2207; 1996.
- 170 **Pappas P.G., Rex J.H., Sobel J.D., Filler S.G., Dismukes W.E., Walsh T.J., Edwards J.E.**; Guidelines for treatment of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 38: 161-189; 2004.
- 171 **Pappas P.G.**; Invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 20: 485-506; 2006.
- 172 **Park H.-O., Bi E.**; Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (1): 48-96; 2007.
- 173 **Park S., Kelly R., Nielsen Kahn J., Robles J., Hsu M.-J., Register E., Li W., Vyas V., Fan H., Abruzzo G., Flattery A., Gill C., Chrebet G., Parent S.A., Kurtz M., Tepler H., Douglas C.M., Perlin D.S.**; Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (8): 3264-3273; 2005.
- 174 **Pasqualotto A.C., Rosa D.D., Medeiros L.R., Severo L.C.**; Candidemia and cancer: patients are not all the same. *BMC Infectious Diseases* 6: 50; 2006.
- 175 **Perea S., Patterson T.F.**; Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clinical Infectious Diseases* 35: 1073-1080; 2002.
- 176 **Perlin D.S.**; Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates* 10: 121-130; 2007.
- 177 **Pfaller M.A., Diekema D.J., Messer S.A., Hollis R.J., Jones R.N.**; In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (3): 1068-1071; 2003.
- 178 **Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V., Sader H.S., Messer S.A., Houston A., Coffman S., Hollis R.J., and The Sentry Participant Group**; Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 747-751; 2000.
- 179 **Pfaller M.A.**; Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases* 22 (Suppl.2): 89-94; 1996.

- 180 **Pfaller M.A.**; Epidemiology of candidiasis. *Journal of Hospital Infection* 30 (Supplement): 329-338; 1995.
- 181 **Pfaller, M.A., Diekema D.J.**; Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20 (1): 133-163; 2007.
- 182 **Prasad R., Kapoor K.**; Multidrug resistance in yeast *Candida*. *International Review of Cytology* 242: 215-248; 2005.
- 183 **Pugliese F., Ruberto F., Cappannoli A., Perrella S. M., Bruno K., Martelli S., Marcellino V., D'Alio A., Diso D., Rossi M., Corradini S. G., Morabito V., Rolla M., Ferretti G., Venuta F., Berloco P.B., Coloni G.F., Pietropaoli P.**; Incidence of fungal infections in a solid organ recipients dedicated intensive care unit. *Transplantation Proceedings* 39: 2005-2007; 2007.
- 184 **Quadota H., Anraku Y., Botstein D., Ohya Y.**; Conditional lethality of a yeast strain expressing human RHOA in place of RHO1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9317-9321; 1994.
- 185 **Quadota H., Python C.P., Inoue S.B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D.E., Ohya Y.**; Identification of yeast Rho 1p GTPase as a regulatory subunit of β -1,3-glucan synthase. *Science* 272: 279-281; 1996.
- 186 **Raaijmakers R., Schröder C., Monnens L., Cornelissen E., Warris A.**; Fungal peritonitis in children on peritoneal dialysis. *Pediatr. Nephrol.* 22: 288-293; 2007.
- 187 **Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L.**; *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* 4 (4): 633-638; 2005.
- 188 **Ridley A.J.**; Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 84: 13-19; 2004.
- 189 **Rodicio R., Koch S., Schmitz H.-P., Heinisch J.J.**; KIRHO1 and KPKC1 are essential for cell integrity signalling in *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 152: 2635-2649; 2006.
- 190 **Roemer T., Jiang B., Davison J., Ketela T., Veillette K., Breton A., Tandia F., Linteau A., Sillaots S., Marta C., Martel N., Veronneau S., Lemieux S., Kauffmann S., Becker J., Storms R., Boone C., Bussey H.**; Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology* 50 (1): 167-181; 2003.
- 191 **Rüchel R.**; Proteinasen pathogener Pilze. *Mycoses* 42 (Suppl.1): 48-52; 1999.
- 192 **Ruhnke M.**; Antimykotische Therapie. In: **Marre R., Mertens T., Trautmann M., Vanek E.**; *Klinische Infektiologie*, S. 134-147; 1.Auflage, München; Urban & Fischer Verlag; 2000.
- 193 **Ruhnke M., Maschmeyer G.**; Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer - review of the literature. *European Journal of Medical Research* 7 (5): 227-235; 2002.
- 194 **Sahai E., Marshall C.J.**; RHO-GTPases and cancer. *Nature Reviews* 2: 133-142; 2002.

-
- 195 **Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.**; Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491; 1988.
- 196 **Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.**; Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354; 1985.
- 197 **Saka A., Abe M., Okano H., Minemura M., Quadota H., Utsugi T., Mino A., Tanaka K., Takai Y., Ohya Y.**; Complementing yeast rho1 mutation groups with distinct functional defects. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (49): 46165-46171; 2001.
- 198 **Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.**; *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press; 1989.
- 199 **Sanglard D., Odds F.C.**; Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases* 2: 73-85; 2002.
- 200 **Saxen H., Virtanen M., Carlson P., Hoppu K., Pohjavuori M., Vaara M., Vuopio-Varkila J., Peltola H.**; Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with a high case fatality rate. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 14 (9): 776-781; 1995.
- 201 **Schabereiter-Gurtner C., Selitsch B., Rotter M. L., Hirschl A.M., Willinger B.**; Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (3): 906-914; 2007.
- 202 **Schaller M., Korting H.C., Schackert C., Eder G., Hube B.**; Sekretorische Aspartatproteasen von *Candida albicans* als Ziel für neuartige Antimykotika. *Chemotherapie Journal* 3: 112-114; 1999.
- 203 **Schaller M., Korting H.C., Schäfer W., Bastert J., Chen W., Hube B.**; Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Molecular Microbiology* 34 (1): 169-180; 1999.
- 204 **Schauer F., Hanschke R.**; Zur Taxonomie und Ökologie der Gattung *Candida*. *Mycoses* 42 (Suppl. 1): 12-21; 1999.
- 205 **Schmidt A., Schmelzle T., Hall M.N.**; The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 45 (5): 1433-1441; 2002.
- 206 **Seeliger H.P.R., Schütt-Gerowitt**; Medizinische Mykologie. In: **Brandis H., Eggers H.J., Köhler W., Pulverer G.**; *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, S. 621-640; 7. Auflage, Stuttgart, Fischer; 1994.

-
- 207 **Seibel N.L., Schwartz C., Arrieta A., Flynn P., Shad A., Albano E., Keirns J., Lau W.M., Facklam D.P., Buell D.N., Walsh T.J.;** Safety, tolerability, and pharmacokinetics of micafungin (FK463) in febrile neutropenic pediatric patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie* 49 (8): 3317-3324; 2005.
- 208 **Senn L., Robinson J. O., Schmidt S., Knaup M., Asashi N., Satomura S., Matsuura S., Duvoisin B., Bille J., Calandra T., Marchetti O.;** 1,3- β -D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clinical Infectious Disease* 46: 878-885; 2008.
- 209 **Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G., Kim S.H., Shin D.H., Lee S.K., Suh S.P., Ryang D.W.;** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (4): 1244-1248; 2002.
- 210 **Smith S.E., Csank C., Reyes G., Ghannoum M.A., Berlin V.;** *Candida albicans* RHO1 is required for cell viability in vitro and in vivo. *FEMS Yeast Research* 2: 103-111; 2002.
- 211 **Sohn K., Urban C., Brunner H., Rupp S.;** EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Molecular Microbiology* 47 (1): 89-102; 2003.
- 212 **Spiess, B., Seifarth W., Hummel M., Frank O., Fabarius A., Zheng C., Mörz H., Hehlmann R., Buchheidt D.;** DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (11): 3743-3753; 2007.
- 213 **Staab J.F., Bradway S.D., Fidel P.L., Sundstrom P.;** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283: 1535-1538; 1999.
- 214 **Staub P., Lermann U., Blaß-Warmuth J., Degel B., Würzner R., Monod M., Schirmeister T., Morschhäuser J.;** Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (1): 146-156; 2008.
- 215 **Staub P., Morschhäuser J.;** Chlamydospore formation on Staub agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 42 (9-10): 521-524; 1999.
- 216 **Staub P., Morschhäuser J., Hacker J.;** Pilze. In: **Marre R., Mertens Th., Trautmann M., Vanek E.;** *Klinische Infektiologie*, S. 28-33, 1.Auflage, München; Urban & Fischer Verlag; 2000.
- 217 **Sundstrom P., Balish E., Allen C. M.;** Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, Hyphal Wall Protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 521-530; 2002.

- 218 **Sung L., Lange B.J., Gerbing R.B., Alonzo T.A., Feusner J.**; Microbiologically documented infections and infection-related mortality in children with acute myeloid leukemia. *Blood* 110: 3532-3539; 2007.
- 219 **Szabò Z., Tóth B., Kovács M., Maráz A., Rozgonyi F., Majoros L.**; Evaluation of the new micronaut-*Candida* system compared to the API ID32C method for yeast identification. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (5): 1824-1825; 2008.
- 220 **Takai Y., Sasaki T., Tanaka K., Nakanishi H.**; Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends in Biochemical Science* 20: 227-231; 1995.
- 221 **Tanaka K.-I., Nambu H., Katoh Y., Kai M., Hidaka Y.**; Molecular cloning of homologs of RAS and RHO1 genes from *Cryptococcus neoformans*. *Yeast* 15: 1133-1139; 1999.
- 222 **Tiedje C., Sakwa I., Just U., Höfken T.**; The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Mol. Biol. Cell.* 19 (7): 2885-2896; 2008.
- 223 **Tortorano A.M., Kibbler C., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Grillot R.**; Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27: 359-366; 2006.
- 224 **Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C., Faure O., Biraghi E., Canton E., Zimmermann K., Seaton S., Grillot R., the ECMM Working Group on Candidemia**; Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 317-322; 2004.
- 225 **Trnovsky J., Merz W., Della-Latta P., Wu F., Arendrup M. C., Stender H.**; Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISH^{Flow}. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (4): 1537-1540; 2008.
- 226 **Trost A., Graf B., Eucker J., Sezer O., Possinger K., Göbel U.B., Adam T.**; Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *Journal of Microbiological Methods* 56: 201-211; 2004.
- 227 **Tsuchimori N., Sharkey L.L., Fonzi W.A., French S.W., Edwards J.E., Filler S.G.**; Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infection and Immunity* 68 (4): 1997-2002; 2000.
- 228 **Tumbarello M., Tacconelli E., de Gaetano Donati K., Morace G., Fadda G., Cauda R.**; Candidemia in HIV-infected subjects. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 18: 478-483; 1999.
- 229 **Valencia A., Chardin P., Wittinghofer A., Sander C.**; The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30 (19): 4637-4648; 1991.

- 230 **van Asbeck E.C., Huang Y.-C., Markham A.N., Clemons K.V., Stevens D.A.;** *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologica* 164: 287-293; 2007.
- 231 **Vermeire J.J., Osman A., LoVerde P.T., Williams D.L.;** Characterization of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 33: 721-731; 2003.
- 232 **Villanueva A., Gotuzzo E., Arathoon E.G., Noriega L.M., Kartsonis N.A., Lupinacci R.J., Smietana J.M., DiNubile M.J., Sable C.A.;** A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. *The American Journal of Medicine* 113: 294-299; 2002.
- 233 **Vincent J.-L., Anaissie E., Bruining H., Demajo W., El-Ebiary M., Haber J., Hiramatsu Y., Nitenberg G., Nyström P.-O., Pittet D., Rogers T., Sandven P., Sganga G., Schaller M.-D., Solomkin J.;** Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med.* 24: 206-216; 1998.
- 234 **Vink E., Rodriguez-Suarez R.J., Gerard-Vincent M., Ribas J.C., de Nobel H., van den Ende H., Duran A., Klis F.M., Bussey H.;** An in vitro assay for (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 1121-1131; 2004.
- 235 **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. and the Invasive Fungal Infection Group of the EORTC;** Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical Infectious Diseases* 28: 1071-1079; 1999.
- 236 **Viudes A., Peman J., Canton E., Salavert M., Ubeda P., Lopez-Ribot J.L., Gobernado M.;** Two cases of fungemia due to *Candida lusitanae* and a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 294-299; 2002.
- 237 **Vollmer T., Störmer M., Kleesiek K., Dreier J.;** Evaluation of a novel broad-range real-time PCR assay for the rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (6): 1919-1926; 2008.
- 238 **Voss A., le Noble J.L., Verduyn Lunel F.M., Foudraine N.A., Meis J.F.;** Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. *Infection* 25: 8-11; 1997.
- 239 **Wahyuningsih R., Freisleben H.-J., Sonntag H.-G., Schnitzler P.;** Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (8): 3016-3021; 2000.
- 240 **Walker L.A., Munro C.A., de Bruijn I., Lenardon M.D., McKinnon A., Gow N.A.R.;** Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLOS Pathogens* 4 (4): 1-12; 2008.

241 **Walsh T.J., Finberg R.W., Arndt C., Hiemenz J., Schwartz C., Bodensteiner D., Pappas P., Seibel N., Greenberg R.N., Dummer S., Schuster M., Holcenberg J.S.;** Liposomal Amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *The New England Journal of Medicine* 340 (10): 764-771; 1999.

242 **Walsh T.J., Pappas P., Winston D.J., Lazarus H.M., Petersen F., Raffalli J., Yanovich S., Stiff P., Greenberg R., Donowitz G., Lee J.;** Voriconazole compared with liposomal Amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *The New England Journal of Medicine* 346 (4): 225-234; 2002.

243 **Walsh T.J., Teppler H., Donowitz G.R., Maertens J.A., Baden L.R., Dmoszynska A., Cornely O.A., Bourque M.R., Lupinacci R.J., Sable C.A., dePauw B.E.;** Caspofungin versus liposomal Amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *The New England Journal of Medicine* 351 (14): 1391-1402; 2004.

244 **Watanabe D., Abe M., Ohya Y.;** Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3- β -glucan synthesis. *Yeast* 18: 943-951; 2001.

245 **Weems Jr J.J.;** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infectious Diseases* 14: 756-766; 1992.

246 **Wherlock M., Mellor H.;** The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *Journal of Cell Science* 115: 239-240; 2002.

247 **White T.C., Marr K.A., Bowden R.A.;** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 11 (2): 382-402; 1998.

248 **Whiteway M., Bachewich C.;** Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 529-53; 2007.

249 **Wilson D.A., Joyce M.J., Hall L.S., Reller L.B., Roberts G.D., Hall G.S., Alexander B.D., Procop G.W.;** Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6): 2909-2912; 2005.

250 **Wingard J.R.;** Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases* 20: 115-125; 1995.

251 **Wingard J.R., Kubilis P., Lee L., Yee G., White M., Walshe L., Bowden R., Anaissie E., Hiemenz J., Lister J.;** Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with Amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 29: 1402-1407; 1999.

252 **Winge P., Brembu T., Bones A.M.;** Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 35 (4): 483-495; 1997.

253 **Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B.**; Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39: 309-17; 2004.

254 **Yamochi W., Tanaka K., Nonaka H., Maeda A., Musha T., Takai Y.**; Growth site localization of Rho 1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 125 (5): 1077-1093; 1994.

255 **Yeramian P., Chardin P., Madaule P., Tavitian A.**; Nucleotide sequence of human rho cDNA clone 12. *Nucleic Acids Research* 15 (4): 1869; 1987.

256 **Yoshida S., Kono K., Lowery D.M., Bartolini S., Yaffe M.B., Ohya Y., Pellman D.**; Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313: 108-111; 2006.

257 **Zhang F.L., Casey P.J.**; PROTEIN PRENYLATION: molecular mechanism and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 241-269; 1996.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Anja Bennewiz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Nachweis und Bedeutung des RHO1-Gens bei verschiedenen *Candida* Spezies“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

27.10.2008

Anja Bennewiz

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulf B. Göbel danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut die Dissertation anzufertigen.

Herrn PD Dr. med. Thomas Adam danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die Betreuung während der experimentellen Arbeit und die hilfreichen Hinweise, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben. Desweiteren möchte ich mich Frau Dr. med. Barbara Graf für die angenehme Zusammenarbeit während der Einarbeitung in die Thematik und die fachliche Unterstützung herzlich bedanken.

Mein Dank gebührt vor allem auch Anke Friedrich, die jederzeit für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt hat, viel Geduld bei der Einweisung in die Labortätigkeit hatte und stets für Fragen offen war.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt meinem Eltern, Herrn Dr. Dr. sc. nat. Klaus Trommler und Frau Dr. Annette Trommler, für die fachliche und moralische Unterstützung und die vielen kritischen Diskussionen, wodurch sie einen entscheidenden Beitrag zur Fertigstellung der Arbeit geleistet haben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden für Ihr Verständnis und die freundschaftliche Unterstützung bedanken, insbesondere bei Denise, Birgit, Annerose und Stephanie-Réka.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinem Mann für die liebevolle Unterstützung, die technische Hilfe beim Layout und die ständige Motivation, ohne die eine Fertigstellung der Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Meinem Sohn Niklas danke ich für die vielen wunderbaren Stunden, aus denen ich immer wieder Kraft schöpfen konnte.