

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen  
Phänotyp, Zellwandzusammensetzung und Genotyp  
in dem humanpathogenen Hefepilz  
*Candida glabrata***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
ALEXANDER SCHWARZ  
aus  
Hofgeismar

Göttingen 2010

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**1. Berichtstatter: PD Dr. med. M. Weig**

**2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. G. Köchel**

**3. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. T. Crozier**

**Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2010**

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Pilze - Allgemeine Einführung	1
1.2 Das Genus <i>Candida</i> - Phylogenie, Epidemiologie und Klinik medizinisch relevanter Spezies	3
1.3. <i>C. glabrata</i> - Ein humanpathogener Hefepilz von steigender Bedeutung	6
1.3.1 Generelle Charakteristika	6
1.3.2 Genetik und Biologie von <i>C. glabrata</i>	8
1.3.3 Virulenzfaktoren von <i>C. glabrata</i>	14
1.3.4 Adaptionsmechanismen von <i>C. glabrata</i>	16
1.4 Struktur der pilzlichen Zellwand	17
1.5 Antimykotika und Resistenzmechanismen	22
1.6 Ziele der Arbeit	28
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>30</b>
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3 Chemikalien und Medien	33
2.1.4 <i>C. glabrata</i> -Stämme	34
<b>2.2 Methoden</b>	<b>43</b>
2.2.1 Anzucht von <i>C. glabrata</i>	43
2.2.2 Isolation genomischer DNA aus <i>C. glabrata</i>	43
2.2.3 Agarosegelelektrophorese	44
2.2.4 Calcofluor-Weiß-Tropftest	44

2.2.5	Mikrodilutionstest mit den Antimykotika Caspofungin und Fluconazol	45
2.2.5.1	Inokulum	45
2.2.5.2	Etablierung der Qualitätskontrolle	46
2.2.5.3	Beschickung der Mikrotestplatten	46
2.2.5.4	Inkubation	47
2.2.5.5	Ablesen der Ergebnisse	47
2.2.6	Mikrodilutionstest mit den wachstumshemmenden Substanzen Blancophor P und Kongorot	48
2.2.7	Durchflusszytometrische Analyse (FACS) zur Quantifizierung von Zellwand-Kohlenhydraten	48
2.2.7.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	48
2.2.7.2	Quantitative Analyse des Chitin- und Glukangehalts der Zellwand	50
2.2.8	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	51
2.2.8.1	Prinzip der PFGE	51
2.2.8.2	Präparation von in Agarose eingebetteter Hefe-DNA	52
2.2.8.3	Durchführung der PFGE mit dem CHEF-DR-II-System	53
2.2.9	Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	55
2.2.9.1	Prinzip des MLST	55
2.2.9.2	Auswertung der Sequenzen	56
2.2.9.2.1	Multiples Alignment	56
2.2.9.2.2	Phylogenetische Bäume	56
2.2.9.2.3	Distanzmethoden	56
2.2.9.2.4	Bootstrapping	57

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung des Laborstamm-Kollektivs</b>	<b>59</b>
3.1.1	Phänotypische Charakterisierung der Laborstämme	59
3.1.2	Quantitative Analyse der Zellwandzusammensetzung ausgewählter Laborstämme mittels Durchflusszytometrie (FACS)	63
3.1.2.1	Quantitative Analyse des Glukangehalts	63
3.1.2.2	Quantitative Analyse des Chitingehalts	64
3.1.2.3	Besteht ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Zellwandzusammensetzung?	65
3.1.3	Genotypische Charakterisierung der Laborstämme	67
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der klinischen Isolate</b>	<b>70</b>
3.2.1	Phänotypische Charakterisierung der klinischen Isolate	71
3.2.1.1	Überprüfung der Zellwandstabilität	71
3.2.1.2	Resistenzbestimmung	73
3.2.1.3	Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Phänotypen	75
3.2.1.3.1	Besteht ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität gegenüber Blancophor P und Kongorot?	75
3.2.1.3.2	Besteht ein Zusammenhang zwischen Zellwandstabilität und Resistenz?	76
3.2.2	Quantitative Analyse der Zellwandzusammensetzung ausgewählter klinischer Isolate mittels Durchflusszytometrie (FACS)	77
3.2.2.1	Quantitative Analyse des Chitingehalts	78
3.2.2.2	Quantitative Analyse des Glukangehalts	78

3.2.2.3	Besteht ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Zellwandzusammensetzung?	79
3.2.3	Phylogenetische Charakterisierung der klinischen Isolate	82
3.2.3.1	Elektrophoretische Karyotypisierung	82
3.2.3.1.1	Klinische Isolate zeigen Unterschiede im Karyotyp	82
3.2.3.1.2	Zeigen klinische Isolate mit chromosomalen Aberrationen der Laborstamm-Karyotypgruppen C(II) und C(III) ähnliche Phänotypen?	85
3.2.3.1.3	Sind bestimmte karyotypische Veränderungen mit charakteristischen Phänotypen assoziiert?	86
3.2.3.1.4	Klinische Isolate mit einem Minichromosom	89
3.2.3.1.5	Sind bestimmte karyotypische Veränderungen mit einer charakteristischen Zellwandzusammensetzung assoziiert?	90
3.2.3.2	Multilokus-Sequenz-Typisierung	91
3.2.3.2.1	Vergleich der molekularen mit der karyotypischen Phylogenie	91
3.2.3.2.2	Zeigen in der Sequenztypisierung isogene Isolate Ähnlichkeiten im Phänotyp und in der Zellwandzusammensetzung?	92
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Phänotypische Charakterisierung der Kollektive	98
4.2	Biochemische Analyse der Zellwände ausgewählter Laborstämme und klinischer Isolate	100
4.3	Genotypische Charakterisierung der Kollektive	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>

<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
6.1	Verzeichnis der Abbildungen	109
6.2	Verzeichnis der Tabellen	111
6.3	Pulsfeld-Gele	111
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
bp	Basenpaare
BP	Blancophor P
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Candida albicans
CBS	Centraal Bureau voor Schimmelcultures
Cg	Candida glabrata
Ch	Chitin
CHEF	Contour Clamped Homogenous Electric Field
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CS	Caspofungin
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al., et alii	und andere
etc., et cetera	und die übrigen
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FE	Fluoreszenz Einheit
FL	Fluconazol
g	Gramm oder Gravitation
g/l	Gramm pro Liter
Gl	Glukan
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kb	Kilobasen (1000 bp)
KR	Kongorot
KT	Karyotyp



l	Liter
M	Molarität
mb	Megabasen
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	Multi Locus Sequence Typing
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
rDNA	ribosomal Desoxyribonucleic Acid, ribosomale Desoxyribonucleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S-DD	Susceptible-Dose Dependent
sek	Sekunde
σ	Standardabweichung
spp.	Subspezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
™	Trademark

U	Units
UV	Ultraviolett
WGA	Wheat Germ Agglutinin, Weizen-Keim-Agglutinin
WT	Wildtyp
x	mal
YCB	Yeast Carbon Base
YNB	Yeast Nitrogen Broth
YPD	Yeast Extract, Pepton, Dextrose
z.B.	zum Beispiel
ZVK	Zentraler Venen-Katheter

# 1 Einleitung

## 1.1 Pilze - Allgemeine Einführung

Etwa ein Viertel der Biomasse unseres Planeten besteht aus Pilzen. Für den Kreislauf von organischen Stoffen in der Natur haben Pilze eine immense Bedeutung. Mit Pflanzenwurzeln symbiotisch lebende Pilze, sog. Mykorrhizen, sorgen für die Nährstoffaufnahme aus dem Boden und spielen so für das Gedeihen von Pflanzen eine unabdingbare Rolle.

Des Weiteren werden Pilze in der Lebensmittelproduktion genutzt, wie zum Beispiel bei der Fermentierung von Wein, Brot und Bier. Als Bestandteil unserer Nahrung sind Hefen und Hutpilze wertvolle Nährstofflieferanten, da sie u.a. viele Vitamine und essentielle Aminosäuren enthalten und reich an Kalium sein können (bspw. der gemeine Pfifferling, *Cantharellus cibarius*). Manche Pilze, wie *Candida utilis*, sind wiederum in der Lage, aus kurz-kettigen, aliphatischen Abfallprodukten aus der Erdöl- und Benzingerinnung Proteine zu synthetisieren, die als Tiernahrung Verwendung finden. In vielen europäischen Ländern wird darüber hinaus der von *Fusarium graminearum* produzierte, Cholesterin- und BSE-freie Fleischersatz Quorn bereits in großen Mengen konsumiert.

Auch in der Pharmazie sind Pilze von großer Bedeutung, werden doch viele Antibiotika von Pilzen synthetisiert. Weitere medizinisch relevante Pilzmetaboliten sind die in der Therapie von Fettstoffwechselstörungen eingesetzten Statine (das von *Aspergillus terreus* produzierte Mevinolin und dessen halbsynthetisches Derivat Simvastatin) oder das zur Immunsuppression verwendete, von *Tolyplocladium inflatum* produzierte Cyclosporin A. Gentechnisch hergestelltes Human-Insulin und der aktuelle Hepatitis-B-Impfstoff werden in Bäckerhefe produziert.

Als gefürchtete Phytopathogene für Nutzpflanzen sind einige Pilzarten mitverantwortlich für beträchtliche Ertragseinbußen in der Landwirtschaft und verursachen somit nicht nur großen wirtschaftlichen Schaden, sondern sind

auch Mitursache für Unterernährung und Hunger in vielen Ländern der dritten Welt.

Von den bis zum heutigen Tage mehr als 1.000.000 bekannten Pilzen sind die meisten für die Gesundheit des Menschen ungefährliche Umweltkeime. Lediglich 400 Arten sind als humane Pathogene in der Lage, Infektionen auszulösen. Zu den medizinisch relevanten Auswirkungen auf den Menschen gehören neben Infektionen und Intoxikationen insbesondere Allergien. Pilzantigene zählen zu den häufigsten Allergenen überhaupt.

Da Pilze trotz vieler Gemeinsamkeiten, wie z.B. heterotropher Ernährung und des Besitzes einer Zellwand, in ihrer Erscheinung äußerst vielgestaltig sind und sich in Vorkommen und biologischer Funktion mitunter beträchtlich voneinander unterscheiden, gestaltete sich ihre taxonomische Klassifizierung als schwierig und wurde zudem im Laufe der Zeit mehrfach abgeändert.

Mittels moderner molekularbiologischer Verfahren lassen sich Pilze in sieben taxonomische Phyla einteilen: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota und Zygomycota (HIBBETT *et al.*, 2007).

Pilze sind in der Lage, sich sexuell oder asexuell zu vermehren. Die sexuelle Form wird dabei als die teleomorphe, oder auch perfekte, die asexuelle als die anamorphe oder auch imperfekte Form bezeichnet. Dies bringt eine zusätzliche Komplexität mit sich. So heißt beispielsweise ein und derselbe Pilz *Cryptococcus neoformans* nach seiner anamorphen Form, jedoch *Filobasidiella neoformans* nach seiner teleomorphen Form. Die Vermehrung erfolgt dabei überwiegend durch die Bildung von Sporen oder durch das sogenannte "budding", das Ausknospen der Tochterzelle aus der Mutterzelle.

Humanpathogene Pilze lassen sich nach dem DHSB-System in Dermatophyten wie *Trichophyton* und *Epidermophyton spp.*, in Sprosspilze (Hefen) wie beispielsweise *Candida albicans*, in Schimmelpilze wie *Aspergillus niger* und *Aspergillus flavus*, und in klassische dimorphe Pilze wie *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatitidis* klassifizieren (GROß, 2006).

## 1.2 Das Genus *Candida* - Phylogenie, Epidemiologie und Klinik medizinisch relevanter Spezies

Die zur Familie der *Candidaceae* gehörenden Hefen wurden früher nach der Art und Weise ihrer Vermehrung unterschieden. Sich asexuell vermehrende Spezies wurden dabei dem Phylum der Deuteromycota, sich sexuell vermehrende Hefen den Ascomycota zugeordnet. Aktuelle phylogenetischen Untersuchungen zufolge sind aber auch die asexuellen Formen der *Candida* spp. den Ascomycota zuzuordnen. Von den heute 163 bekannten *Candida* Spezies ist nur ein kleiner Teil humanpathogen, was u.a. auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass ca. zwei Drittel der Arten nicht in der Lage sind, bei einer Temperatur von 37°C zu wachsen und somit den Menschen als Wirt zu kolonisieren (CASADEVALL, 2005; ODDS, 1988).

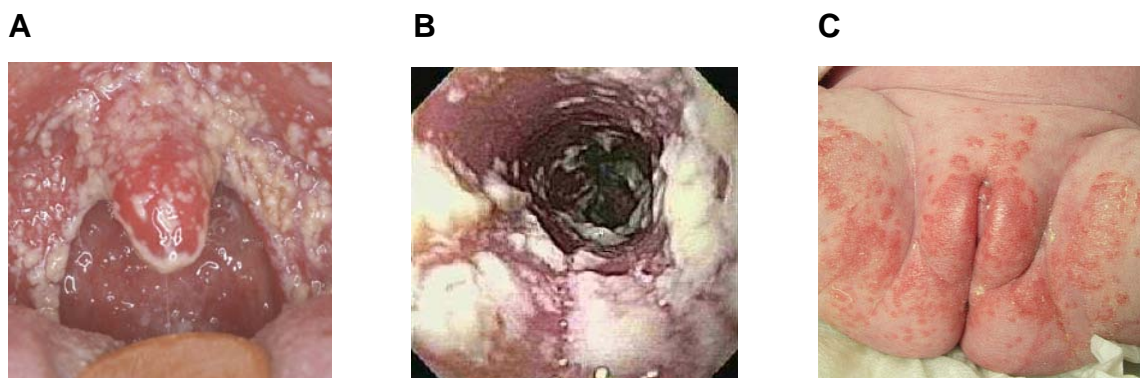
Zu den medizinisch relevanten Arten gehören neben *C. albicans* die sogenannten non-albicans-Spezies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* und *C. krusei*.

Breit angelegte Studien aus den USA ergaben, dass über 80 % aller nosokomialen invasiven Pilzinfektionen auf Spezies der Gattung *Candida* zurückzuführen sind (FRIDKIN und JARVIS, 1996). *Candida* spp. sind fakultativ pathogene Erreger, die sich häufig in der endogenen Mund- oder Darm-Flora gesunder Menschen finden lassen, wo sie als harmlose Kommensalen in Symbiose mit Bakterien-Spezies verschiedenster Taxa, wie z.B. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* oder *Neisseriaceae* leben. So können beispielsweise in Stuhlproben gesunder Menschen in Deutschland zu 70% *C. albicans* und zu 15% *C. glabrata* nachgewiesen werden. Im immunkompetenten Wirt verursachen *Candida* spp. vor allem oberflächliche Infektionen von Haut und Schleimhäuten (ODDS, 1994). Zwar besitzt das Vaginalepithel der Frau als lokalen angeborenen Abwehrmechanismus eine antifungale Aktivität, trotzdem entwickeln bis zu 75 % der Frauen zumindest einmal in ihrem Leben eine Episode einer vaginalen Candidose. Fünf bis zehn Prozent von ansonsten gesunden Frauen leiden unter wiederkehrenden vulvovaginalen Candidosen. Auch hier ist *C. glabrata* die am häufigsten nachgewiesene Hefe unter den non-albicans spp (BAROUSSE et al., 2004, 2005; FIDEL et al., 1999, YANO et al.

2005). Die Ursachen für diese Infektionen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Jedoch werden nicht-chronisch verlaufende vaginale Candidosen in erster Linie auf lokale Irritationen, wie zu enge, schlecht belüftete Unterwäsche, oder temporäre Veränderungen, wie Antikontrazeptiva, schlechte Ernährung oder Antibiotikatherapie zurückgeführt. Chronische Verlaufsformen von mehr als vier Episoden pro Jahr können ähnlich wie im Falle der oralen Candidose ein erstes Anzeichen auf das Vorliegen anderer systemischer Erkrankungen sein (RINGDAHL, 2000).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Frauen, deren Vaginalepithel über eine verminderte antifungale Aktivität verfügt, für die chronische Verlaufsform der vaginalen Candidose prädisponiert sind (BAROUSSE *et al.*, 2005).

Bei Neugeborenen verursacht *Candida* relativ häufig die so genannte Windel-Dermatitis, wohingegen *Candida*-Infektionen der Schleimhäute des Oropharynx und der Speiseröhre oftmals als eine Erstmanifestation von AIDS in Erscheinung treten (Abbildung 1). Darüber hinaus kann es durch ein Eindringen von *Candida spp.* in den Blutstrom zu einem disseminierten Befall des gesamten Organismus mit schweren, lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen kommen. Die am häufigsten befallenen Organe sind hierbei die Lunge, Leber, Milz und Nieren.



**Abbildung 1: Manifestationen der Candidose**

(A) Orale Candidose (Online: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kiessling-cornelia-2005-04-28/HTML/chapter2.html> (Stand: 10.02.2010)). (B) Endoskopisches Bild eines ausgeprägten Befundes einer ösophagealen Candidiasis (Online: [http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Esophagus/Candida\\_Esophagitis/candida\\_esophagitis.html](http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Esophagus/Candida_Esophagitis/candida_esophagitis.html) (Stand: 10.02.2010)). (C) Durch *Candida* hervorgerufene Windel-Dermatitis bei einem Neugeborenen (Online: <http://www.skincarenet.org/candidiasis.html> (Stand: 10.02.2010)).

Prädisponierende Faktoren für eine systemische Candidose sind iatrogene Immunsuppression im Rahmen von Organ- oder Knochenmarkstransplantationen und in der Therapie von Malignomen, AIDS, angeborene oder erworbene Immundefekte, Langzeit-Hospitalisierung und Intensivstation-Aufenthalte.

Als weitere Risikofaktoren gelten metabolische Störungen, wie Diabetes mellitus, traumatisch bedingte Zerstörung der Barrierefunktion von Haut und Schleimhäuten, zentral-venöse Katheter und der vermehrte Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika (PFALLER und DIEKEMA, 2007).

Die steigende Inzidenz nosokomialer systemischer Candidosen führt durch längere Hospitalisierung der Patienten zu erhöhten medizinischen Kosten und letztlich zu einer nicht unwesentlichen finanziellen Belastung des Gesundheitswesens (PFALLER und DIEKEMA, 2007).

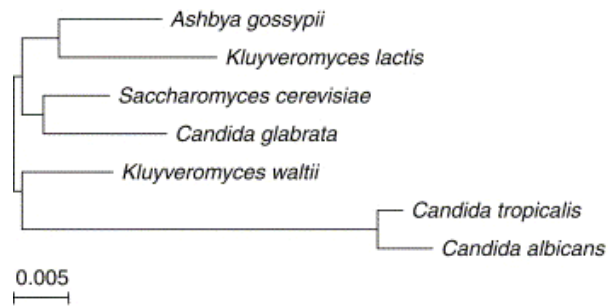
Nach wie vor ist *C. albicans* die am häufigsten aus Blutkulturen und Gewebeproben isolierte Hefe-Spezies. Dies dürfte unter anderem auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass *C. albicans* als einzige aller bekannten *Candida* Arten ihren primären Standort beim Menschen besitzt (HUBE, 2004; BgVV, Bericht 2001). Allerdings konnte im Verlauf der neunziger Jahre eine epidemiologische Veränderung hin zu den sogenannten *non-albicans spp.*, wie *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. dubliniensis* beobachtet werden (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 2007), was auf den häufigen Gebrauch von Triazolen zurückgeführt wurde (GIRMENIA und MARTINO, 1998; HORN *et al.* 2009). Unter diesen *non-albicans Candida spp.* stellt *C. glabrata* mit 19 % aller in Deutschland verzeichneten invasiven Hefepilz-Infektionen des Erwachsenen den wichtigsten Vertreter dar (BORG-VON ZEPPELIN *et al.*, 2007).

## 1.3 *C. glabrata* - ein humanpathogener Hefepilz von steigender Bedeutung

### 1.3.1 Generelle Charakteristika

*C. glabrata* und die eng verwandte Bäckerhefe *S. cerevisiae* gehören zum Subphylum der *Saccharomycotina*. Angehörige Arten dieser phylogenetischen Gruppe liegen meist als einzelne Zellen vor und vermehren sich vegetativ mittels Ausknospung. Älteren taxonomischen Einteilungen zu folge wurden sie auch als Hemiascomyceten beschrieben. Obgleich sie demselben Genus angehören, ist *C. glabrata* näher mit *S. cerevisiae* verwandt, als mit dem humanpathogenen Hefepilz *C. albicans* (KAUR *et al.*, 2005, Abbildung 2). Trotz vieler Ähnlichkeiten im Zellwandaufbau und in der Signaltransduktion, zeigen diese drei Hefen sehr unterschiedliche individuelle Eigenschaften und Merkmale, vom Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Oberflächenproteine, bis hin zu unterschiedlichen Phänotypen bei Deletion oder Überexpression homologer Gene (Tabelle 1). Bis gegen Ende der zweiten Hälfte des 20sten Jahrhunderts basierten taxonomische Kategorisierungen größtenteils auf morphologischen Kriterien, jedoch konnten mittels moderner molekularbiologischer Techniken enge verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Spezies nachgewiesen werden, die nach früheren taxonomischen Kriterien als grundlegend unterschiedlich klassifiziert worden sind. So hieß beispielsweise *C. glabrata*, bevor sie 1978 dem Genus *Candida* zugeordnet wurde, nach ihrer Entdeckung im Jahre 1917 *Cryptococcus glabratus* und ab 1938 *Torulopsis glabrata* (ODDS, 1988). Heute ermöglicht die Identifikation und taxonomische Klassifikation unterschiedlicher Spezies anhand von modernen molekularbiologischen Methoden, wie Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-Analysen (RFLP), PCR-Fingerprinting und Sequenzierungen, beispielsweise der variablen D1/D2 Domäne der 26S rDNA (BUTLER *et al.*, 2004; DIEZMANN *et al.* 2004; SUGITA und NISHIKAWA, 2004), eine verglichen mit der phänotypischen wesentlich präzisere Einteilung.





**Abbildung 2: Phylogenie von *C. glabrata***

*C. glabrata* ist phylogenetisch enger mit der apathogenen Bäckerhefe *S. cerevisiae* verwandt, als mit *C. albicans* (aus KAUR *et al.*, 2005, S. 379).

Im Gegensatz zu *C. albicans* besitzt die Besiedlung von Warmblütern für *C. glabrata*, wie auch für *C. krusei*, eine eher sekundäre Bedeutung. *C. glabrata* ist vor allem in der Umwelt weit verbreitet, da sie sich durch die Möglichkeit, verschiedenste Stoffe wie Xylolose, Kohlenwasserstoffe oder die wachsartige Cuticulaschicht auf Pflanzenoberflächen verwerten zu können, an verschiedenste Habitate anzupassen vermag. So ist *C. glabrata* auf verrottendem Obst, in Fruchtsäften und anderen Lebensmitteln, im Boden, sowie in Streu, Schlamm, Süßwasser, in der Luft und auf verschiedenen Insektenarten zu finden (BgVV, Bericht 2001). Durch die Fähigkeit als Biofilm zu wachsen, ist es ihr darüber hinaus möglich, natürliche und künstliche Oberflächen, wie z.B. Plastikkatheter, zu besiedeln (IRAQUI *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite ist *C. glabrata* ein humanpathogener Opportunist von steigender Bedeutung und der zweithäufigste Verursacher einer systemischen Candidose in immunsupprimierten Patienten nach *C. albicans* (PFALLER und DIEKEMA, 2007). Epidemiologische Daten in Deutschland zeigen folgendes Verteilungsmuster für aus Blutkulturen isolierte *non-albicans spp.*: *C. glabrata* ist mit 19,1 % die am häufigsten isolierte Hefe, gefolgt von, *C. parapsilosis* (8,0%) und *C. tropicalis* (7,5%) (BORG VON ZEPELIN *et al.*, 2007).

Oftmals entstehen Infektionen aus der endogenen Mikroflora des Wirts heraus. Obwohl *C. glabrata* eine enge Verwandtschaft mit dem apathogenen Hefepilz *S. cerevisiae* aufweist, sind Infektionen mit einer hohen Mortalität verbunden. Einer der Gründe hierfür stellt die von Natur aus geringe Empfindlichkeit und oftmals erworbene Resistenz gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol dar, welches heute als Standardtherapeutikum zur Behandlung von systemischen

*Candida*-Infektionen eingesetzt wird (HITCHCOCK *et al.*, 1993; VANDEN BOSSCHE *et al.*, 1992).

Tabelle 1: Vergleich der Hauptmerkmale von *S. cerevisiae*, *C. glabrata* und *C. albicans*

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
<b>Natürliches Habitat</b>	Pflanzen, Früchte	Pflanzen, Früchte, Boden, Insekten, mikrobielle Flora des Menschen	Mikrobielle Flora des Menschen
<b>Pathogenität</b>	nicht humanpathogen	opportunistisch	opportunistisch
<b>Infektionsformen</b>	nicht infektiös	lokal (Haut, Schleimhäute) disseminierend	lokal (Haut, Schleimhäute) disseminierend
<b>Klinische Relevanz (% aller Candidosen)</b>	nicht relevant	bis 20 %	50-60 %
<b>Genom/ Chromosomenanzahl</b>	haploid und diploid/16	haploid/13	diploid/8
<b>"Mating"-Gene</b>	vorhanden	vorhanden	vorhanden
<b>Sexuelle Vermehrung</b>	ja	unbekannt	ja (kryptisch)
<b>Morphologie/Wachstumsformen</b>	monomorph/ Hefeform, (Pseudohyphen)	monomorph/ Hefeform, (Pseudohyphen)	dimorph/ Hefeform, Hyphen, Pseudohyphen, Chlamydosporen
<b>"Phenotypic Switching"</b>	nein	ja	ja
<b>Biofilm-Formation</b>	ja	ja	ja
<b>Adhäsion</b>	Sexuelle Agglutinine, Lectine (FLO-Familie)	Lectine (EPA-Familie)	Lectine (HWP1, Als-Familie)
<b>Azol-Suszeptibilität</b>	suszeptibel	hyposuszeptibel	suszeptibel

### 1.3.2 Genetik und Biologie von *C. glabrata*

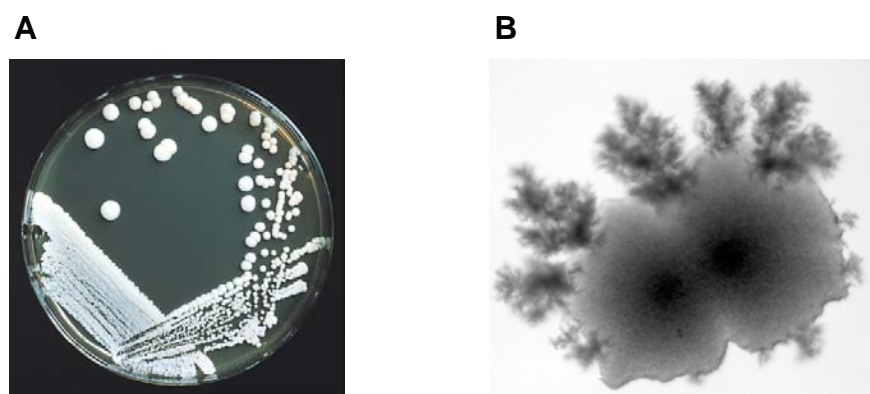
Der zur Gruppe der *Ascomyceten* gehörende Hefepilz *C. glabrata* ist ein asexueller, einzelliger Organismus mit einem haploiden Genom, der sich durch Ausprossung der Tochterzelle aus der Mutterzelle vermehrt. Die Ausknospung erfolgt hierbei unipolar. *C. glabrata*-Zellen verfügen über eine rundlich bis ellipsoide Form und eine durchschnittliche Größe von 3,4 x 2,0 µm. Sie sind

nicht zur Ausbildung von Chlamydosporen befähigt und liegen typischerweise eng beieinander liegend in Gruppen vor. Das Genom von *C. glabrata* besteht aus dreizehn Chromosomen (A bis M), die in einer Länge von 485 bis ca. 2300 kb vorliegen. Insgesamt ergibt sich eine Gesamtgenomgröße von ungefähr 13 mb. *C. glabrata*-Stämme zeigen eine auffällig starke genomische Variabilität. Es werden karyotypische Alterationen wie Translokationen, Deletionen, Duplikationen und Längenpolymorphismen beobachtet. Solche genotypischen Aberrationen können unter anderem spontan im Rahmen von Adaptionsvorgängen beobachtet werden und konsekutiv zu Veränderungen im Phänotyp, bzw. Resistenzverhalten führen, die einen Selektionsvorteil für den jeweiligen Stamm darstellen können (FISCHER *et al.*, 2006; MARICHAL *et al.*, 1997; POLAKOVA *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2007). Besonders die beiden größten Chromosomen L und M variieren in ihrer Größe relativ stark. Sie beherbergen die variablen rDNA-Loci mit einem hohen Anteil an repetitiven Sequenzen (ASAKURA *et al.*, 1991; SHIN *et al.*, 2007).

Obwohl *C. glabrata* erwiesenermaßen eine klonale Populationsstruktur aufweist (DODGSON *et al.*, 2005), besitzt sie die genetischen Grundvoraussetzungen zur sexuellen Reproduktion, weswegen sie zur Gruppe der Ascomycota, und nicht, wie die meisten anderen asexuellen Pilze, zur Gruppe der Deuteromycota gezählt wird. Es konnte ein putativer "*mating type*"-Locus (MTL1) identifiziert und untersucht werden (FABRE *et al.*, 2005; SRIKANTHA *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2003), der den Paarungstyp der Hefezelle determiniert. Hierbei handelt es sich um ein orthologes Gen des MAT-Locus in *S. cerevisiae* (HABER, 1998), das entweder für die a- oder  $\alpha$ -Variante des Paarungstyps kodiert. Die Regulation der Transkription dieses Gens erfolgt durch den MAT-Promotor. Die Genprodukte haben eine regulatorische Funktion u.a. in Bezug auf die Peptidhormone Faktor-a und Faktor- $\alpha$ . Diese Pheromone binden an Zellen des jeweils anderen "*mating types*" und bewirken so die Fusion beider Zellen (MADIGAN und MARTINKO, 2006). Darüber hinaus besitzt *C. glabrata* mindestens noch 31 weitere zu *S. cerevisiae* orthologe Gene, die nachweislich eine Rolle bei der Paarung oder Meiose spielen. Es konnte gezeigt werden, dass *C. glabrata in vivo* zwischen den beiden Genotypen MTL1a und MTL1 $\alpha$  zu wechseln vermag. Des Weiteren konnte ein Wechsel zwischen den beiden

Genotypen in infizierten Patienten beobachtet werden. So ist beispielsweise die Pathogenese von vaginalen Infektionen nicht auf einen einzelnen "*Mating Typ*" begrenzt (BROCKERT *et al.*, 2003). Dieser durch eine homothallische Endonuklease via Strangbruch und anschließende homologe Rekombination katalysierte Wechsel des Genotyps konnte sowohl in der *Saccharomyces sensu-stricto*-Gruppe, wie auch seinen Verwandten *C. glabrata*, *Kluyveromyces delphensis* und *Saccharomyces castellii* beobachtet werden (BUTLER *et al.*, 2004).

*C. glabrata* ist ein leicht zu kultivierender Organismus, der an ein breites pH- und Temperaturspektrum *in vivo* und *in vitro* angepasst ist. So ist es ihm beispielsweise möglich, sowohl im sauren Milieu der Vagina bei einem pH von 4,0, als auch bei einem pH von 7,4. in der Blutbahn des Menschen zu wachsen. Unter Standard-Laborbedingungen (z.B. auf YPD-, YNB- oder Sabouraud-Platten, inkubiert bei 30°C oder 37°C), wächst *C. glabrata* in kleinen, glänzenden Kolonien von weicher Konsistenz mit einer weißlich-cremigen Farbe (Abbildung 3A). Wenn der Pilz unter Stickstoff-Mangelbedingungen kultiviert wird, bildet er Pseudomyzel (CSANK und HAYNES, 2000, Abbildung 3B). Pseudomyzelien entstehen zwar ebenfalls durch Aussprossung aus Hefezellen, die neu entstandenen Zellen bleiben dabei jedoch mit den Elternzellen verbunden und elongieren lediglich. Als morphologisch auffälliges Merkmal sind Einschnürungen der Zellwände im Bereich zwischen den Zellen zu beobachten.



**Abbildung 3: Phänotypen von *C. glabrata***

(A) *C. glabrata* wächst auf Sabouraud-Agar in glatten, weißlich-cremefarbenen Kolonien. (B) Auf Stickstoff-limitierenden Medien bildet *C. glabrata* Pseudomyzel (aus CSANK and HAYNES, 2000, S. 117).

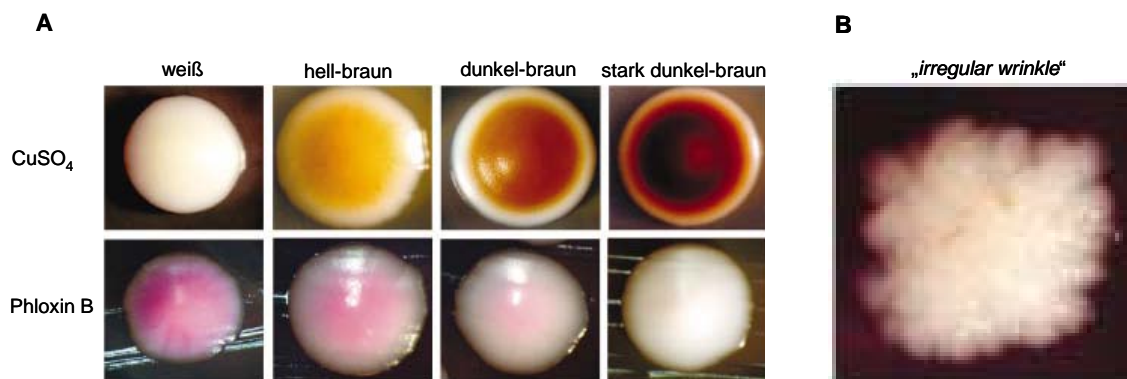
Darüber hinaus zeigt *C. glabrata* unter bestimmten Bedingungen weitere morphologische Charakteristika, wie phänotypisches "switching", Kolonie-Pigmentierung und Wachstum in Biofilm-Formation, die die Pathogenität entscheidend mitbeeinflussen können.

Das morphologische Phänomen des phänotypischen "switchings" wurde sowohl für *C. albicans*, als auch für *C. glabrata* und *C. tropicalis* mehrfach in der Literatur beschrieben und als Virulenzfaktor diskutiert (LACHKE *et al.*, 2002; SLUTSKY *et al.*, 1985; SOLL *et al.*, 1987). Es beruht auf einer phänotypischen Instabilität, die mit einem veränderten Expressionsprofil bestimmter, an Assimilations-Prozessen und Stress-Resistenz beteiligten Genen, sowie mit chromosomaler Rekombination einhergehen kann (RAMSEY *et al.*, 1994; RUSTCHENKO-BULGAC *et al.*, 1990; RUSTCHENKO-BULGAC, 1991; SRIKANTHA *et al.*, 2005).

Wird *C. glabrata* auf CuSO<sub>4</sub>-haltigen Medien kultiviert, lassen sich vier verschiedene Phänotypen nach ihrer Koloniefarbe unterscheiden: weiß, hellbraun, dunkelbraun und stark dunkelbraun (Abbildung 4A). Diese Phänotypen unterscheiden sich im Grad der Expression des MTII-Gens, welches für Metallothionein kodiert, sowie der Frequenz des "switchings" und ihrer Färbung bei Subkultivierung auf Phloxin-B-enthaltenden Medien. Neben diesen vier durch das so genannte "core switching"-System hervorgerufenen Phänotypen konnte ein weiterer Phänotypen-Wechsel *in vitro* beobachtet werden, der "irregular wrinkle"-Phänotyp (IW<sub>r</sub>). Dieser Phänotyp besitzt eine, verglichen mit der regulären, runzlig-faltige Kolonieoberfläche (Abbildung 4B). Dies lässt darauf schließen, dass neben dem "core switching"-System ein weiteres durch diesen Phänotyp repräsentiertes "switching"-System existiert. Während die "core"-Phänotyp-Kolonien vornehmlich aussprossende Hefezellen enthalten, bestehen die Kolonien des "wrinkle"-Phänotyps auch ohne Stickstofflimitation fast ausschließlich aus Pseudohyphen bildenden Zellen.

Diese phänotypische Variabilität scheint Hefezellen *in vivo* die Möglichkeit zu verleihen, sich dem Immunsystem des Wirtsorganismus durch die Veränderung antigener Strukturen zu entziehen und Resistenzen gegen antifungale Medikamente zu entwickeln (BOUCHARA *et al.*, 2000; SOLL *et al.*, 1987; VARGAS *et al.* 2004). So konnte in zahlreichen Studien belegt werden, dass bei der durch Hefen bedingten Vulvovaginitis verschiedene Phänotypen

ätiopathogenetisch involviert sein können (BROCKERT *et al.*, 2003; LIPPERHEIDE *et al.*, 2002).



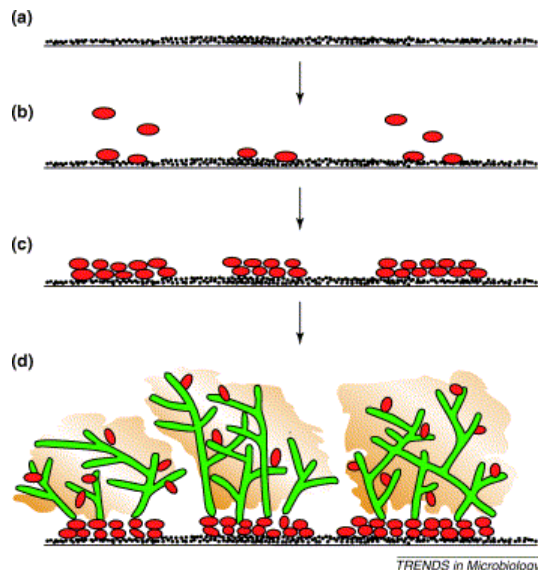
**Abbildung 4: *C. glabrata* zeigt unterschiedliche Koloniemorphologien**

(A) Kultivierung auf CuSO<sub>4</sub>- und Phloxin-B-supplementiertem Agar. (B) „irregular wrinkle“-Phänotyp (aus LACHKE *et al.*, 2002, S. 2665)

Verschiedene medizinisch relevante Pilze sind in der Lage, durch die Metabolisierung bestimmter Nährstoffquellen Pigment-Farbstoffe zu synthetisieren, die einen möglicherweise Virulenz-assoziierten Phänotyp bedingen. Die Humanpathogene *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus* sind in der Lage, das Pigment Melanin zu synthetisieren, welches zu einer Pathogenitätssteigerung in beiden Spezies führt (LIU und NIZET, 2009). Ähnlich wie der zur Gruppe der Basidiomyceten gehörende Hefepilz *Malassezia furfur*, ist *C. glabrata* in der Lage, Pigmente aus verschiedenen Indol-Komponenten zu bilden, wenn sie auf Medien kultiviert wird, die Tryptophan als einzige Stickstoffquelle enthalten (MAYSER *et al.*, 2007). Bislang ist jedoch nicht bekannt, inwiefern diese Fähigkeit die Virulenz von *C. glabrata* beeinflussen kann.

Die Fähigkeit, in Biofilm-Formation wachsen zu können, ist eine weitere Eigenschaft, die mit der Manifestation einer symptomatischen Klinik und dem Auftreten von Medikamentenresistenzen von fungalen und anderen mikrobiellen humanen Pathogenen zusammenhängen kann (GRANSLO *et al.*, 2008; IKONOMIDIS *et al.*, 2009; NETT *et al.*, 2007). Ein Biofilm besteht aus einer Gemeinschaft einzelner Zellen, die in einer extrazellulären polymeren Matrix eingebettet sind (Abbildung 5). Diese spezielle Formation ermöglicht dem Zellverband das Wachstum auf verschiedensten Oberflächen, u.a. auch auf

alloplastischem Material, wie venösen Kathetern, künstlichen Herzklappen und Prothesen. Die Suszeptibilität gegenüber antimikrobiellen Medikamenten kann dabei um ein vielfaches reduziert sein. Für Hefen besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Resistenzen gegenüber gängigen Antimykotika und einer quantitativen Veränderung der Zellwandkomposition von in Biofilm-Formation wachsenden Zellen. Ein Vergleich zwischen planktonischen Zellen mit Biofilmen von *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. parapsilosis* ergab einen bis zu zehnfach erhöhten Glukangehalt der Zellwände *in vivo* und *in vitro*, bei gleichzeitig um bis zu 1000-fach erhöhter Antimykotikatoleranz (NETT *et al.*, 2007).



**Abbildung 5: Stufen-Schema der Biofilm-Ausbildung**

(a) & (b) Einzelne Zellen adhärieren an eine Oberfläche. (c) Diese Zellen bilden Mikrokolonien, die extrazelluläre Matrix produzieren. (d) Der wachsende Biofilm zeigt Zellen mit myzelialem Wachstum und in extrazelluläre Matrix eingebettete Hefezellen (aus Douglas, 2003, S. 30).

### 1.3.3 Virulenzfaktoren von *C. glabrata*

Obwohl *C. glabrata* und *C. albicans* beide als opportunistische fungale Pathogene in der Lage sind, den Menschen als Wirt zu kolonisieren und sich in ähnlichen ökologischen Nischen anzusiedeln, konnte durch phylogenetische Analysen bestätigt werden, dass beide Organismen sich bereits vor langer Zeit evolutionär auseinander entwickelten. Somit ist es wahrscheinlich, dass beide Pilze sowohl spezies-exklusive Strategien zur Wirtskolonisation entwickelt haben, als auch gemeinsame Adaptionsmechanismen und Virulenz-Faktoren besitzen.

Über die genauen Mechanismen der Pathogenität und Virulenz von *C. glabrata* ist bislang nur wenig bekannt. *C. albicans* ist diesbezüglich in vielerlei Hinsicht untersucht und charakterisiert worden.

Seit mehr als 30 Jahren ist bekannt, dass pH-Veränderungen die morphologische Differenzierung von *C. albicans* beeinflussen. Während unter aziden Bedingungen bevorzugt das Wachstum in der Hefe-Form beobachtet werden kann, wird filamentöses Wachstum durch pH-Werte im alkalischen Bereich induziert (BRAUN und JOHNSON, 2000; BUFFO et al., 1984; LEE KL et al., 1975). Dem Wachstum in Hyphenform wurde die Fähigkeit zur Gewebepenetration und invasivem, disseminiertem Befall des Wirtsorganismus zugesprochen (GOW et al., 2003; LO et al., 1997).

Im Gegensatz zu *C. albicans* ist *C. glabrata* nicht zur Ausbildung von Hyphen befähigt. Daher sind im Falle von pH-Veränderungen keine vergleichbaren morphologischen Veränderungen zu beobachten. Die Pathogenität von *C. glabrata* wird somit einzig und allein von der Hefeform vermittelt. Da es *C. glabrata* jedoch möglich ist, dieselben ökologischen Nischen wie *C. albicans* zu kolonisieren, muß sie über eine ähnliche genetische Grundausstattung verfügen, die ihr ähnliche Flexibilität in der Anpassung und Virulenz verleiht.

Virulente *C. albicans* Stämme sind zur Sekretion von Aspartylproteinasen und Phospholipasen befähigt, die durch die Zerstörung der Keratinschicht epithelialen Gewebes die Wirtsinvasion ermöglichen (CHANDRA et al., 2001). Zwar ist *C. glabrata* ebenfalls in der Lage, Proteinase zu synthetisieren, allerdings sind diese bislang nicht näher spezifiziert worden (CHAKRABARTI et al., 1991), bzw. lediglich GPI-verankert an strukturellen Umbauprozessen



beteiligt, die sich auf die Adhärenzfähigkeit des Pilzes auswirken können (KAUR *et al.*, 2007).

Die Adhärenzfähigkeit an die Wirtszellen stellt einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor von humanpathogenen Hefen dar. Das Ausmaß der Adhärenz wird dabei entscheidend durch die Hydrophobie der Zelloberfläche (engl. CSH = *cell surface hydrophobicity*) des Pilzes beeinflusst, die wiederum von den umgebenden Milieubedingungen mitbedingt wird (DE GROOT *et al.*, 2008; KLOTZ *et al.* 1985; HAZEN *et al.* 1986; FIDEL *et al.* 1999). KLOTZ *et al.* konnten zeigen, dass *C. glabrata* eine mit *C. albicans* vergleichbare CSH besitzt. In vergleichenden *in vitro*-Studien mit vaskulären Endothelzellen besaß *C. albicans* innerhalb der Gattung *Candida* jedoch das größte Adhärenzpotential, während dieses bei *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. kefyr* am geringsten ausgeprägt war (KLOTZ *et al.*, 1983).

Im Gegensatz zu *C. albicans* verfügt *C. glabrata* nicht über  $\beta_2$ -Integrine als Adhäsionsrezeptoren, was eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das schwächere Adhäsionspotenzial von *C. glabrata* sein könnte (BENDEL *et al.*, 1991). Die Bedeutung anderer Oberflächenadhäsine, wie z. B. Fibronectin- und Lamininrezeptoren, Fibrinogen-bindende Proteine sowie Mannoproteine wurde für *C. albicans* vielfach diskutiert (HOSTETTER 1994). Des Weiteren sind für *C. albicans* eine Gruppe von Zellwandproteinen isoliert worden, die kompetitiv an Rezeptoren auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten binden und den peroxidasevermittelten fungiziden Effekt durch die Inhibition der Myeloperoxidase zu beeinträchtigen vermögen (WRIGHT *et al.* 1981). Die Funktion o. g. Rezeptoren und Proteine als Virulenzfaktoren von *C. glabrata* ist bisher noch nicht näher verifiziert worden, obwohl über 50 % aller mittels *in silico* Analysen identifizierten putativen GPI-Proteine der Zellwand Adhäsion-ähnliche Sequenzcharakteristika aufweisen (DE GROOT *et al.*, 2008).

Das bereits unter 1.3.2 beschriebene Phänomen des phänotypischen "switching" zählt ebenfalls zu den Virulenzfaktoren von Hefen und wurde bei *C. albicans* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet. Es ist auf eine phänotypische Instabilität zurückzuführen, die bei einigen Stämmen atypische Koloniformen hervorbringt (SOLL *et al.*, 1987). Dieses Phänomen wurde auch bei *C. glabrata* beobachtet (LACHKE *et al.*, 2002; LIPPERHEIDE *et al.*, 2002). Möglicherweise wird dadurch die Virulenz verstärkt und die Entstehung von

symptomatischen Infektionen begünstigt (FIDEL *et al.* 1999, BROCKERT *et al.*, 2003). Eine weitere Gemeinsamkeit beider Hefen ist ihre hohe genomische Flexibilität, die sich sowohl auf die Virulenz, als auch auf die Adaption an die stark fluktuierenden Bedingungen des Wirtsmilieus auswirken kann. Darüber hinaus ist die von Natur aus reduzierte Suszeptibilität gegenüber Azol-Antomykotika ein charakteristischer Phänotyp von *C. glabrata*. Diese intrinsische Resistenz könnte einen wichtigen, die Virulenz beeinflussenden Faktor von *C. glabrata* darstellen. Diese Hypothese wird zusätzlich von der Beobachtung gestützt, dass *C. glabrata* hauptsächlich bei Patienten unter Langzeit-Azol-Therapie aus prophylaktischen oder therapeutischen Gründen isoliert werden kann (BOUCHARA *et al.*, 2000; PFALLER *et al.*, 2004).

#### 1.3.4 Adaptionsmechanismen von *C. glabrata*

Am Infektionsort muss *C. glabrata* mit verschiedensten, teils unwirtlichen Bedingungen fertig werden. Temperatur und pH-Veränderungen führen zu erschwertem Aufrechterhalten von Protonengradienten, zu veränderten Enzymaktivitäten und Nährstoffangebot, sowie zu Änderungen in der Zusammensetzung des Polysaccharid-Netzwerks und in der Proteipopulation der Zellwand.

Um das Überleben des Pathogens zu sichern, muß eine adäquate und schnelle Adaption an die jeweiligen Bedingungen erfolgen. Hefen besitzen eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, Umweltreize wahrzunehmen und die jeweiligen Signale von der Zelloberfläche über Transduktionskaskaden zum Zellkern zu transportieren. Diese Signaltransduktionswege sind vor allem in die Wahrnehmung und die Reaktion auf Umweltstress, pH-Veränderungen und Veränderungen im Nährstoffangebot ausgerichtet, wie der Proteinkinase A- (PKA), der Rim101- und der TOR- (*target of rifampycin*) Weg (LAMB *et al.*, 2001; THEVELIN und DE WINDE, 1999).

Der essentiellste aller Signaltransduktionswege ist jedoch der mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Weg (MAPK). Das Kernstück bildet dabei eine aus drei mitogen-aktivierten Kinasen bestehende Kaskade, die sich durch Phosphorylierung gegenseitig aktivieren. Diese MAPK-Kaskade kontrolliert über verschiedenste Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl an zellulären Prozessen durch die

Verarbeitung von intra- und extrazellulären Stimuli. Für *S. cerevisiae* sind bislang fünf verschiedene MAPK-Wege beschrieben worden, die unter anderem an der Pheromon-Antwort bei der Paarung, der Induktion von filamentösem Wachstum, der Sporenbildung und der Zellwandintegrität bei Stressexposition von elementarer Bedeutung sind (CHEN RE und THORNER, 2007). *C. glabrata* besitzt putativ orthologe Gene für nahezu alle diese Signaltransduktionswege, die bereits größtenteils im Hinblick auf ihren Einfluss auf das Zellwachstum und die Virulenz untersucht worden sind.

Der "*high osmolarity glycerol pathway*" (HOG) und die damit assoziierte STE-Genfamilie spielen u.a. eine entscheidende Rolle für die Zellwandintegrität, die Osmosensitivität der Zelle, bzw. bei der Adaption an hypertone Stresssituationen, die Virulenz, sowie unter Stickstoff-Mangelbedingungen induziertem filamentösem Wachstum (CALCAGNO *et al.*, 2003; 2004; 2005; GREGORI *et al.*, 2007).

Desweiteren unterliegt die Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität unter Stressbedingungen, wie Hitze, Hypoosmolarität des umgebenden Milieus und Zellwand-pertubierenden Substanzen, der sensibel regulierten Kontrolle des "*cell wall integrity*"-MAPK-Wegs (LEVIN, 2005). Zusätzlich erfolgt die Regulierung der Instandhaltung der Zellwandstruktur und der Chitinsynthese in *C. glabrata* durch den PKC-Weg, der darüber hinaus in die Resistenzentstehung gegenüber Caspofungin und Azolen involviert ist (COTA *et al.*, 2008; EDLIND *et al.*, 2005). Zellen, die Defekte in diesem Signaltransduktionsweg aufweisen, zeigen ausgeprägte Wachstumshemmung bei Exposition gegenüber Zellwand-pertubierenden Substanzen, wie z.B. Diaminostilbenen, Kongorot, Caspofungin und SDS (SCHWARZMÜLLER, 2009).

## 1.4 Struktur der pilzlichen Zellwand

Als die am äußersten gelegene Struktur spielt die Zellwand eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Morphologie und der direkten Interaktion von Wirt und Pathogen. Sie schützt die Pilzzelle vor Lyse und Degradierung durch feindliche Enzyme, sorgt für die Aufrechterhaltung des Zellurgors und reguliert

und ermöglicht die selektive Aufnahme von Substanzen aus der Umgebung. Darüber hinaus spielen die verschiedenen Komponenten der Zellwand eine entscheidende Rolle bei der Gewebsadhäsion und -invasion, als Schutz vor Verteidigungsmechanismen des Wirtsorganismus, sowie in der Formation von Biofilmen und der Resistenzentwicklung gegenüber antifungalen Medikamenten (DE GROOT *et al.*, 2004; NAGLIK *et al.*, 2006; NETEA *et al.*, 2006; PARDINI *et al.*, 2006; TUMBARELLO *et al.*, 2007; WHEELER *et al.*, 2006). Über Jahrzehnte war die einzige Information über die pilzliche Zellwand die biochemische Zusammensetzung ihrer strukturellen Hauptkomponenten: Polysaccharide und Proteine. Mittels moderner biochemischer und genetischer Untersuchungsmethoden konnten die Funktionen vieler an Struktur und Synthese der Zellwand beteiligter Proteine analysiert werden. Da die Zellwand von pilz-spezifischen Enzymen synthetisiert wird und somit über exklusive strukturelle Komponenten und antigene Determinanten verfügt, die in Säugetierzellen so nicht vorkommen, ist sie ein vielversprechender Angriffspunkt sowohl für Antimykotika als auch diagnostischer Methoden in der Infektionsserologie.

Die Mehrheit der Studien, die sich mit der Zusammensetzung und der Struktur der pilzlichen Zellwand befassen, beziehen sich auf den Modellorganismus *S. cerevisiae*. Der molekulare Aufbau der Zellwand dieses Ascomyceten ist deshalb gut dokumentiert (AGUILAR-USCANGA und FRANCOIS, 2003; CABIB *et al.*, 2007; KAPTEYN *et al.*, 1997; KLIS *et al.*, 2006; POPOLO *et al.*, 1997). Auch die Zellwand von *C. albicans* wird mehr und mehr erschlossen (CHAFFIN *et al.*, 1998; KLIS *et al.*, 2001; PARDINI *et al.*, 2006; RUIZ-HERRERA *et al.*, 2005). Über die molekulare Organisation der Zellwand von *C. glabrata* existieren jedoch bisher nur wenige Studien (DE GROOT *et al.* 2008; FRIEMAN *et al.*, 2002; KAUR *et al.*, 2005; WEIG *et al.*, 2004).

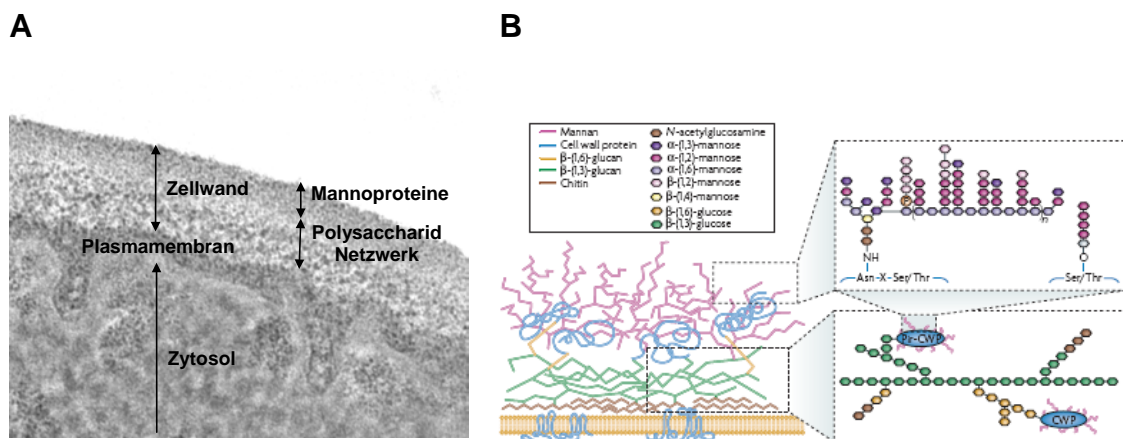
Die Zellwand von Hefen besteht hauptsächlich aus den Polysacchariden Chitin,  $\beta$ -1,3-Glukan,  $\beta$ -1,6-Glukan und hochgradig mannosylierten Proteinen (Abbildung 6).

Chitin ist ein 1,4- $\beta$ -verknüpftes Homopolymer aus N-Acetylglucosamin, welches die Plasmamembran bedeckt und somit die innerste Schicht der Zellwand bildet. Sie bestimmt maßgeblich die Rigidität der Zellwand. Der prozentuale Anteil von Chitin in der Zellwand variiert zwischen 1 % - 3 % in *S. cerevisiae* und von 1 % - 2 % in *C. albicans* (BROWN and CATLEY, 1992; FLEET, 1985). Der Chitingehalt von *C. glabrata* macht ungefähr 1% des Trockengewichts der Zellwand aus (WEIG *et al.*, 2004). Mittlerweile sind verschiedene Gene katalytischer Untereinheiten von Isoenzymen der Chitinsynthase und deren Produkte isoliert und untersucht worden. So übernehmen jeweils unterschiedliche Isoformen dieses Enzyms die Chitinsynthese des Primärseptums, der lateralen Zellwand, für Reparaturvorgänge während der Zellteilung, sowie für die Synthese des "bud ring" an der Stelle der Tochterzellenausknospung (POPOLLO *et al.*, 1996; WALKER *et al.*, 2008).

Glukane sind fibrilläre, über Wasserstoffbrückenbindungen verbundene Polymere aus Glukose, die bei Ascomyceten entweder  $\beta$ -1,3-glykosidisch oder  $\beta$ -1,6-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Sie machen bei *Candida spp.* ca. 40-60 % des Zellwandtrockengewichts aus und liegen ungefähr im Verhältnis 2:1 vor (HOF H., 2003).

$\beta$ -1,3-Glukan bindet nach innen über nicht-reduzierende Enden kovalent an das darunter liegende Chitin und nach außen an stark verzweigtes  $\beta$ -1,6-Glukan. Ein geringer Anteil an  $\beta$ -1,6-Glukan ist direkt glykosidisch an Chitin gebunden (KAPTYEN *et al.*, 1997). Auf diese Weise entsteht ein elastisches, dreidimensionales Netzwerk, das sogenannte Zellwandskelett. Dieses ist gleichzeitig für die mechanische Stabilität und durch ständigen Umbau auch für die Flexibilität der Zellwand verantwortlich ist. (CHAFFIN *et al.*, 1998; KAPTEYN *et al.*, 1997; KLIS, 1994). Spezielle GPI-verankerte Transglykosidasen sind dabei einerseits für die Polymerisierung des Glukans verantwortlich und sorgen zum anderen für die Verknüpfung des Glukans mit der Chitinschicht (PARDINI *et al.*, 2006).

Die äußerste Schicht der Zellwand besteht größtenteils aus kovalent gebundenen, stark glykosylierten Proteinen, den sogenannten Mannoproteinen (KLIS, 1994; KLIS *et al.*, 2006), die für Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität, elektrische Ladung, Adhäsion und die Zell-Agglutinierbarkeit verantwortlich sind und somit letztlich auch die Pathogenität vermitteln. Mannoproteine machen bis zu 40% des Zellwandtrockengewichts aus (HOYER, 2001; HOYER und HECHT, 2001; RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006; SUNDSTROM *et al.*, 2002a). Man unterscheidet drei Klassen von kovalent an das Zellwandskelett gebundenen Proteinen: (i) Glycosyl-Phosphatidylinositol- (GPI) verankerte Proteine, (ii) über eine Alkali-labile Bindung verankerte Proteine, zu denen unter anderem die Pir-Proteine (*protein with internal repeats*) gehören, und (iii) über Disulfidbrücken an andere Zellwandproteine gebundene Proteine. Spezielle Sequenzmotive entscheiden darüber, ob das jeweilige GPI-Protein in der Plasmamembran verbleibt, oder ob es kovalent an  $\beta$ -1,6-Glukan gebunden in die Zellwand transloziert wird. Alkali-sensitiv-gebundene Proteine binden hingegen direkt an  $\beta$ -1,3-Glukan (DE GROOT *et al.*, 2005; DE GROOT *et al.*, 2008).



**Abbildung 6: Zellwandstruktur von *C. glabrata***

Die Zellwand von Hefen besitzt eine Dicke von schätzungsweise 250-260 nm. Im elektronenmikroskopischen Bild (A) können zwei Schichten unterschieden werden: Eine elektronendichte äußere Schicht, bestehend aus Mannoproteinen und die elektronentransparente Polysaccharid-Schicht. (B) Schematische Darstellung der Struktur der Hefe-Zellwand: Aufgeführt sind die strukturellen Hauptkomponenten Chitin und Glukan, sowie die in das Zellwandskelett eingebundenen Mannoproteine. Vergrößert dargestellt ist die monomere Komposition der einzelnen Polymere (aus NETEA *et al.*, 2008, S. 69).

Biochemische Analysen haben gezeigt, dass die Zellwand von *C. glabrata* bis zu 50 % mehr Protein enthält als die Zellwand von *S. cerevisiae*. (DE GROOT *et al.*, 2008). Der Grad der Glykosylierung der Zellwandproteine hat darüber hinaus Einfluss auf die Permeabilität der Zellwand für Makromoleküle (DE NOBEL *et al.*, 1990; ZLOTNIK *et al.*, 1984). Abhängig von den umgebenden Bedingungen (wie beispielsweise dem pH-Wert, der Temperatur, oxidativem oder hoch-osmolarem Stress, aeroben oder anaeroben Wachstumsbedingungen), Wachstumsphase (z.B. logarithmische oder stationäre Phase), Wachstumsform und die Phase des Zellzyklus, kann sowohl der Gehalt der Zellwand an Chitin und Glukan, als auch die Zusammensetzung der Zellwand-Protein-Population erheblich variieren.

Diese Mechanismen erhöhen somit die Anpassungsfähigkeit des Pilzes (ABRAMOVA *et al.*, 2001; CARO *et al.*, 1998; DE NOBEL *et al.* 1991, DE GROOT *et al.*, 2008; KAPTEYN *et al.*, 2000; KLIS *et al.*, 2001; RODRIQUEZ-PENA *et al.*, 2000).

Auch wenn nicht alle GPI-Proteine letztendlich in der Zellwand ankommen, so weist doch die Anzahl von 106 durch *in-silico*-Analysen vorausgesagten GPI-verankerten Zellwand-Proteinen in *C. glabrata* auf ein hohes Potential an regulierter, spezifisch angepasster Zellwand-Protein-Expression in diesem Pilz hin (DE GROOT *et al.*, 2008; WEIG *et al.*, 2004).

Verglichen mit anderen Hefen verfügt *C. glabrata* über eine außergewöhnlich hohe Anzahl an Genen, die für Adhäsion-ähnliche GPI-Proteine kodieren. Phylogenetisch lassen sich diese Proteine wiederum in verschiedene Gruppen einordnen, wie z.B. die in Adhäsion und Biofilmbildung involvierte Lektin-ähnliche EPA-Familie. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Zellwand-Protein-Expression und die Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität nicht nur entscheidend für Stressresistenz ist, sondern ebenso für die Virulenz von *C. glabrata* (CALCAGNO *et al.*, 2003; DE GROOT *et al.*, 2008).

## 1.5 Antimykotika und Resistenzmechanismen

Aufgrund der metabolischen Ähnlichkeiten von Wirt und den ebenfalls eukaryontischen pathogenen Pilzen, gestaltet sich die Entwicklung von effektiven und gut verträglichen antimykotischen Substanzen schwieriger als beispielsweise bei bakteriellen Erregern.

Lange Zeit galt das zur Substanzgruppe der Polyene gehörige Amphotericin B wegen seines breiten Wirkspektrums und mangels Alternativen als Goldstandard in der Therapie von systemischen Mykosen (ODDS *et al.*, 2003). Es ist ein sehr lipophiler Stoff, der mit dem Ergosterol der pilzlichen Zellmembran einen irreversiblen Komplex bildet und so zu einer veränderten Membranpermeabilität führt. Es ist höchst wirksam gegen die meisten klinisch relevanten Hefen und andere Pilzarten, wie z. B. *Aspergillus spp.*. Unglücklicherweise besitzt Amphotericin eine sehr geringe Löslichkeit und eine hohe Nephrotoxizität. Das seit einigen Jahren auf dem Markt befindliche liposomale Amphotericin B (Ambisome<sup>®</sup>) stellt eine weniger toxische Alternative dar.

Trotz langjähriger, weitverbreiteter Anwendung sind sekundäre Resistenzen selten. Es existieren aber einige intrinsisch resistente Spezies, wie z.B. *C. lusitanae*. Polyenresistente *Candida spp.* verfügen über einen verminderten Ergosterolgehalt der Plasmamembran, was wahrscheinlich die Bindung des Antimykotikums an die Pilzzelle beeinträchtigt (NOLTE *et al.*, 1996).

Flucytosin ist ein Nukleosid-Analogon, das vornehmlich in der Kombinationstherapie von Candidosen eingesetzt wird. Die Aufnahme in die Zielzelle erfolgt durch das Enzym Cytosin-Permease. Durch die intrazelluläre Verstoffwechslung zu 5-Fluor-Uracil mit nachfolgender Inkorporation in die mRNA kommt es zu einer Unterbrechung der Proteinbiosynthese und so letztlich zu einer Wachstumshemmung. Darüberhinaus wird 5-Fluor-Uracil in 5-Fluor-dUMP umgewandelt, welches die Thymidylat-Synthase und somit die DNA-Synthese und die Zellteilung inhibiert. Resistenzen gegen Flucytosin können u.a. durch Mutationen in Enzymen hervorgerufen werden, die in den Substanz- und/oder RNA-Metabolismus involviert sind und sind sowohl für

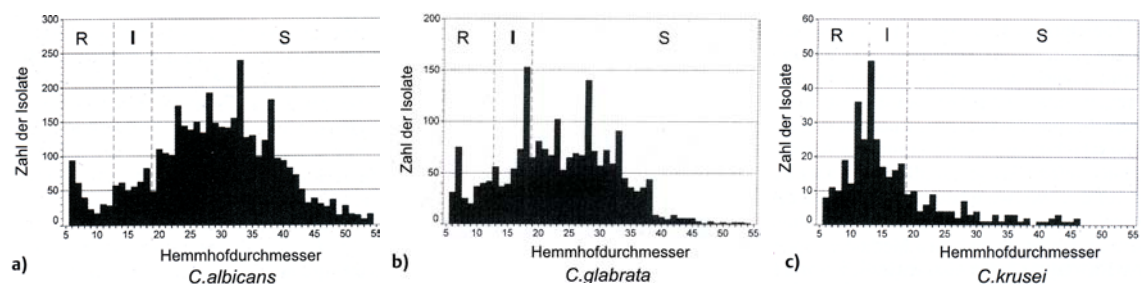


Hefen, als auch für Aspergillen beschrieben worden. Da Resistenzen in der Monotherapie sich schnell auf die gesamte Population ausbreiten können, wird Flucytosin fast nur in Kombination mit Amphotericin B verwendet (MORSCHHÄUSER, 2003; ODDS *et al.*, 2003). Populationsgenetische Untersuchungen an *C. albicans* ergaben, dass Flucytosin-Resistenzen gehäuft bei phylogenetisch eng verwandten Stämmen auftreten. Flucytosin-resistente Isolate, die über eine Punktmutation in dem Enzym Uracil-Phosphoribosyltransferase verfügten, zeigten alle ähnliche Sequenztypcharakteristika und fanden sich zum Großteil in einer der fünf für *C. albicans* beschriebenen phylogenetischen Haupt-Kladen (DODGSON *et al.*, 2004).

Anfang der 70er Jahre erfolgte die Einführung der Gruppe der Azole in der antimykotischen Therapie humanpathogener Pilze. Praktisch parallel dazu hielt diese Stoffgruppe Einzug im Pflanzenschutz und später auch als antimikrobieller Zusatz in der Kosmetikproduktion. Azolderivate besitzen ein Di- bzw Triazol-Grundgerüst, welches die antimykotische Wirkung dieser Substanzen vermittelt und viele chemische Modifikationen zulässt. Die fungistatische Wirkung der Azole beruht auf der Blockierung der Ergosterolbiosynthese über eine Inhibierung des pilzspezifischen Cytochrom-P450-Enzyms Lanosterol-14- $\alpha$ -Demethylase (Erg11/Cyp51).

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Wachstumshemmung durch Azole ist die intrazelluläre Bildung und Akkumulation intermediärer toxischer Metabolite aus der Ergosterol-Vorstufe Lanosterol. Auf der anderen Seite kann der Mangel von Ergosterol als integraler Bestandteil der Plasmamembran ursächlich in Betracht gezogen werden. Das heute in der Regel zur Behandlung von Candidosen eingesetzte Triazol Fluconazol besitzt eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber den meisten Hefen (z.B. *C. albicans*, *C. parapsilosis* oder *C. tropicalis*) und Dermatophyten (z.B. *Microsporum audouinii*), gegen die meisten Schimmelpilze (z.B. *Aspergillus spp.*) ist es hingegen wirkungslos (TIETZ, 2004). Obwohl es Leberschäden verursachen kann, ist es weitaus weniger toxisch und somit besser verträglich als Amphotericin B.

Im Gegensatz zu den meisten anderen *Candida spp.* ist *C. glabrata* weniger suszeptibel oder sogar resistent gegenüber Fluconazol (PFALLER *et al.*, 1999, Abbildung 7). Dieser Umstand erfordert entweder eine Dosiserhöhung, eine Verlängerung der Therapiedauer, oder das Erwägen alternativer Behandlungsstrategien. Es konnte gezeigt werden, dass die Fluconazol-Suszeptibilität getesteter *C. glabrata*-Isolate erheblich variiert, mit einer Spannweite von 82 % bis 44 %, abhängig unter anderem vom Alter des Patienten und der geographischen Lokalisation (PFALLER *et al.*, 2003a). Jüngsten Studien zufolge sind 93% aller in Deutschland getesteten *C. albicans* Isolate, aber nur 23 % aller *C. glabrata* voll suszeptibel gegenüber Fluconazol. 50 % der *C. glabrata*-Isolate wurden als S-DD ("susceptible-dose dependent") eingestuft, was eine Behandlung mit höheren Dosen oder den Wechsel der Wirkstoffklasse erforderlich macht (BORG VON ZEPELIN *et al.*, 2007). Seit Einführung der neuen Breitspektrum-Triazole (z.B. Voriconazol) steht eine verbesserte Therapieoption zur Behandlung fluconazolresistenter *Candida spp.* zur Verfügung. Diese Wirkstoffe sind im Vergleich zu ihren Vorgängern um einiges effektiver (PFALLER *et al.*, 2003b), allerdings konnten bereits Kreuzresistenzen beobachtet werden (MÜLLER *et al.*, 2000).



**Abbildung 7: Verteilungsmuster der E-Test-MHK-Werte von Fluconazol klinischer *Candida*-Isolate**

Die humanpathogenen *non-albicans spp.* *C. glabrata* (b) und *C. krusei* (c) sind vermindert suszeptibel, bzw. sogar resistent gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol. Dies bedingt eine Linksverschiebung der Verteilungskurve verglichen mit Azol-suszeptiblen Hefen, wie z.B. *C. albicans* (a). R = resistent, I = intermediär / S-DD, S = suszeptibel (modifiziert aus Hof, 2003, S. 62).

Für *C. glabrata* und andere fungale Pathogene sind bereits mehrere Resistenzvermittelnde Mechanismen beschrieben worden. Neben den Möglichkeiten der reduzierten Aufnahme des Pharmakons in die Zelle, beispielsweise durch Veränderungen in der Membranpermeabilität oder der

Zellwandzusammensetzung, der vermehrten intrazellulären Sequestration und Inaktivierung, sowie Veränderungen in der Zielstruktur, gilt vor allem die Hochregulierung von ABC-Transportern, bzw. von Efflux-Pumpen als der bislang am besten untersuchte Mechanismus.

So führt die Überexpression der Efflux Pumpen CgCgr1 und CgPdh1 unter Azol-Exposition zu einer rapiden Resistenzentwicklung in *C. glabrata*. Bei diesen Genen handelt es sich um Orthologe des *S. cerevisiae*-ABC-Transporters ScPdr5 und der *C. albicans*-Efflux-Pumpen CaCdr1 und Cdr2 (SANGLARD *et al.*, 1999). Die Transkription dieser beiden ABC-Pumpen steht unter Kontrolle des Regulator-Gens CgPDR1. Zusätzlich wird die Efflux-Aktivität durch den Grad der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A reguliert (WADA *et al.*, 2005).

Gelegentlich kann bei Subkultivierung von *C. glabrata* auf Glycerol-enthaltenden Medien der sogenannte Petite-Phänotyp beobachtet werden, der eine charakteristische Kolonie-Morphologie, sowie mitochondriale Defekte zeigt. Für diese Atmungs-defizienten Petite-Mutanten wurde ein Zusammenhang zwischen Azolresistenz, erhöhtem Efflux durch Hochregulierung der Gene CgCDR1 und CgPDH1, Veränderungen auf genetischer Ebene und einer veränderten quantitativen Zusammensetzung der Zellwand beschrieben (BRUN *et al.*, 2005). Des Weiteren können Punktmutationen, Überexpression, sowie verstärkte Genamplifizierung des Zielenzym Erg11 für die Resistenzentstehung verantwortlich sein.

All diese Mechanismen der Resistenzentstehung können durch hohe genomische Flexibilität beträchtlich beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass in der diploiden Hefe *C. albicans* die Entstehung von Azolresistenzen oftmals mit dem Erwerb eines Isochromosoms zusammenhängt, welches aus den zwei linken Armen von Chromosom 5 besteht. Diese Region beherbergt die beiden Gene *ERG11*, welches für das Ziel Enzym von Fluconazol in der Ergosterolbiosynthese kodiert, die Lanosterol-14- $\alpha$ -Demythelase, und *TAC1*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, welcher die Expression der beiden Gene *CDR1* und *CDR2* reguliert, die wiederum für Multidrug-Transporter der ABC-Superfamilie kodieren. Durch deren gemeinsame Duplizierung und konsekutiver vermehrter Expression und Transkription ist der Pilz in der Lage, hohe Azol-Konzentrationen zu tolerieren (SANGLARD *et al.*, 1997),

wohingegen die alleinige *ERG11*-Überexpression in *C. albicans* nicht für eine erhöhte Azoltoleranz verantwortlich ist (SANGLARD *et al.*, 1995; WHITE, 1998). Auch für *C. glabrata* wurden bereits ähnliche Mechanismen zur Resistenzentstehung beschrieben. Polakova *et al.* berichteten von einem Fluconazol-resistenten Isolat, das in der elektrophoretischen Karyotypisierung über ein Minichromosom im niedermolekularen Bereich verfügte. Bei Kultivierung ohne Selektionsdruck verschwand das Minichromosom und die Toleranz gegenüber Fluconazol veränderte sich von resistent zu suszeptibel. Marichal *et al.* hingegen postulierten für ein Azol-resistentes Isolat, das eine Duplikation von Chromosom E aufwies, auf welchem sich das *ERG11*-Gen befindet, einen ähnlichen Mechanismus, wie er bereits oben für *C. albicans* beschrieben wurde (MARICHAL *et al.*, 1997; POLAKOVA *et al.*, 2009).

Desweiteren zeigten sequentielle klinische Isolate aus Blutkulturen immunsupprimierter Patienten während des Infektionsprozesses mitunter binnen weniger Tage rapide karyotypische Veränderungen, die eine erhöhte Azoltoleranz zur Folge hatten (SHIN *et al.*, 2007).

Auch andere Arbeiten an Mikroorganismen mit bekannter karyotypischer Variabilität, wie dem parasitären Protozoon *Leishmania*, zeigen, dass Aneuploidie, Deletionen und verstärkte Genamplifikation mit veränderter Medikamententoleranz und Virulenz assoziiert sein können (UBEDA *et al.*, 2008).

Eine neue Klasse von antifungalen Substanzen sind die Echinocandine, welche die  $\beta$ -1,3-Glukan-Synthese inhibieren und somit die Zellwand als die äußere Schutzschicht der Pilzzelle zerstören oder zumindest stark schwächen. Die antifungale Wirkung der Echinocandine ist bereits seit den frühen siebziger Jahren bekannt und untersucht worden (BENZ *et al.*, 1974). Seit 2002 ist Caspofungin (Cancidas<sup>®</sup>) als das erste Echinocandin für den Einsatz am Menschen zugelassen worden. Sein Wirkspektrum umfasst viele medizinisch relevante *Candida spp.* (z.B. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* (PFALLER *et al.*, 2003a; 2003b)), wie auch *Aspergillus spp.*. Es existieren aber auch wichtige humanpathogene Pilze (z.B. *C. neoformans*), die das Wirkspektrum von Caspofungin nicht erfasst.

Die Gründe hierfür sind vielschichtig. Zum einen kann eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand, beispielsweise ein erniedrigter Gehalt an  $\beta$ -1,3-Glukan (v.a. Basidiomyceten), ursächlich sein, zum anderen eine kompensatorische Hochregulierung des Chitingehalts, um einer Schwächung der Zellwand durch  $\beta$ -1,3-Glukan-Verlust entgegenzuwirken (v.a. Ascomyceten). Solche Kompensationsmechanismen konnten in Mutanten beobachtet werden, die entweder in ihrer Fähigkeit zur  $\beta$ -1,3-Glukan-Synthese beeinträchtigt waren oder von Natur aus über eine geschwächte Zellwand verfügten (COTA *et al.*, 2007; KAPTEYN *et al.*, 1997; POPOLO *et al.*, 1997, WALKER *et al.*, 2008).

In der Literatur ist darüber hinaus dokumentiert, dass nur Stämme mit einer spezifischen Mutation, bzw. Aminosäure-Polymorphismen in der Hot Spot-Region der Gene *FKS1* und *FKS2*, welche für essentielle Komponenten der Glukan-Synthase kodieren, und/oder einer Überexpression von Sbe2p, einem Golgi-Protein, dass in den Transport von Zellwandkomponenten involviert ist, Resistenzen gegenüber Echinocandinen aufweisen (BALASHOV *et al.*, 2006). Desweiteren ist mittlerweile bekannt, dass es keine Kreuzresistenzen zwischen Caspofungin und Fluconazol gibt, da Caspofungin kein, bzw. ein unpassendes Substrat für die meisten Multidrug-Efflux-Transporter darstellt, die an der Vermittlung von Azol-Resistenzen maßgeblich beteiligt sind (NIIMI *et al.*, 2006; PFALLER und DIEKEMA, 2007). Azolresistente Stämme mit einer Überexpression der Transporter Cdr1/3 und Mdr1 sind in der Regel voll suszeptibel auf Caspofungin (BACHMANN *et al.*, 2002). Nichtsdestotrotz konnte für *C. albicans* eine erhöhte Caspofungin-Toleranz bei gleichzeitiger Überexpression des Efflux-Pumpen-Gens *CDR1* *in vitro* nachgewiesen werden (SCHUETZER-MUEHLBAUER *et al.*, 2003).

Caspofungin besitzt nur geringe Nebenwirkungen, was im Vergleich zu anderen Antimykotika eine entscheidende Verbesserung darstellt. Demgegenüber stehen allerdings das relativ enge fungizide Wirkspektrum und die intravenöse Applikation als einzige Darreichungsform (CORNELLY *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die derzeit zur Verfügung stehenden Antimykotika entweder über eine erhebliche Toxizität verfügen, sich nur für ein begrenztes Spektrum an Erregern einsetzen lassen, oder das Auftreten von Sekundärresistenzen eine effektive Therapie erschwert. Mit der Einführung der Echinocandine hat sich die Zellwand als neuer effektiver Angriffspunkt für Antimykotika erwiesen, da sie an Strukturen angreifen, die nur die Pilzzelle, nicht aber die Wirtszelle besitzt. Analog zur erfolgreichen Behandlung schwerer bakterieller Infektionen könnten somit in Zukunft auch Kombinationstherapien zum Einsatz kommen, wie beispielsweise die Kombination von Echinocandinen mit einem Chitinsynthase-Inhibitor wie Nikkomycin Z oder Chitinbindnern aus der Stoffgruppe der Diaminostilbene (LI und RINALDI, 1999; WALKER *et al.*, 2008).

## 1.6 Ziele der Arbeit

*C. glabrata* ist ein opportunistischer humanpathogener Hefepilz von steigender medizinischer Bedeutung. Systemische Infektionen mit *C. glabrata* sind aufgrund der hohen intrinsischen Resistenz gegenüber dem Standard-Antimykotikum Fluconazol nur schwer zu behandeln. Darüber hinaus besitzt *C. glabrata* eine äußerst dynamische Zellwandstruktur, die es der Hefezelle ermöglicht, flexibel auf Stresssituationen aus dem sie umgebenden Wirtsmilieu zu reagieren. Durch die verstärkte Synthese spezifischer Zellwandkomponenten ist der Pilz beispielsweise in der Lage, durch Antimykotika verursachte Zellschäden zu kompensieren (COTA *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2008).

Die beiden häufigsten humanpathogenen Hefen *C. albicans* und *C. glabrata* verfügen des Weiteren über eine sehr hohe Genomflexibilität, die in Verbindung mit veränderten phänotypischen Merkmalen, wie klinisch relevantem Resistenzverhalten stehen kann (FISCHER *et al.*, 2006; MARICHAL *et al.*, 1997; POLAKOVA *et al.*, 2009; SELMECKI *et al.*, 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen, wie z.B. Medikamentenresistenz und Toleranz gegenüber Zellwandstress, der quantitativen Zusammensetzung der Zellwand sowie spezifischen Veränderungen auf genotypischer Ebene bei *C. glabrata* zu untersuchen. Hierzu wurde ein Kollektiv isogener Proben des

Laborreferenzstamms ATCC2001/CBS138 und ein Kollektiv von 124 heterogenen klinischen Isolaten aus verschiedenen europäischen Zentren etabliert.

Die phänotypische Charakterisierung beider Kollektive erfolgte durch standardisierte Suszeptibilitätstests auf die Zellwand-aktiven Substanzen Blancophor P, Calcofluor Weiß und Kongorot, sowie die klinisch relevanten Antimykotika Caspofungin und Fluconazol. Die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber den unterschiedlichen Substanzen wurde anschließend miteinander verglichen, um zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit zwischen der Toleranz gegenüber Zellwandstress und Antimykotikaresistenz besteht.

Die Zellwandkomposition wurde durch spezifische Färbung der beiden strukturellen Hauptkomponenten Chitin und Glukan und anschließende Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Daraufhin wurde durch eine lineare Regressionsanalyse überprüft, inwiefern die Daten aus den phänotypischen Tests Rückschlüsse auf die quantitative Zellwandkomposition erlauben und ob mögliche Korrelationen bestehen.

Die Genotypisierung beider Kollektive erfolgte mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und Multilokus-Sequenztypisierung (MLST). Die PFGE ermöglicht die Bestimmung der karyotypischen Phylogenie durch den Vergleich von Chromosomenzahl und -größe. Die MLST dient der Analyse der molekularen Phylogenie auf Basis von Nukleotidsequenzen hochkonservierter Haushaltsgene.

Aus den Sequenzdaten der MLST der klinischen Isolate wurde im Anschluss ein phylogenetischer Stammbaum erstellt und jedem Stamm sein karyo- und phänotypisches Profil zugeordnet. Auf diese Weise konnte abschließend die molekulare mit der karyotypischen Phylogenie verglichen und deren Einfluss auf die unterschiedlichen Merkmalsausprägungen der Stämme beurteilt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Chemikalienwaage Typ BL 310	Sartorius
FACS-Calibur	BD Biosciences
Fastprep™ FP120, Bio101	Thermosavatan
Gasbrenner, Flammy S	Schütt
Geldokumentation, Biodoc II	Biometra
Gelelektrophoresekammern	Keutz-Labortechnik
Inkubator, Typ BB 6220 CU	Heraeus
Magnetrührer	Heidolph
PFGE- System:	
CHEF-DR-II-System und Zubehör:	Bio-Rad
- Drive module	
- Elektrophoresekammer	
- Pulswave 760 switcher	
- Power 200/2.0 power supply	
- Pumpe	



Zubehör:

- 10-Proben-Gießform
- 10-zähliger Kamm
- Gelgießstand 8,25“ x 5“
- Kammhalter 8,25“
- Ersatzelektroden

pH-Meter, HI 221

HANNA Instruments

Photometer, Ultrospec® 1000

Amersham Pharmacia  
Bioscience/Ge-Healthcare

Pipetten „Reference“; Typ 4810;

Satz 0, 5 -10 µl; 10-100 µl; 50-200 µl; 100-1000µl

Eppendorf

Pipettierhilfe Pipetus®-Akku

Plattenphotometer

Dynex Revelation

Präzisionswaage, Typ CP224

Sartorius

Schüttler, Typ 3020, GFE und Typ Duomax 1030

Heidolph

Sterilbank, BDK  
GmbH

Luft- und Raumtechnik

Thermomixer „compact“

Eppendorf

Transferpette R-12 20-200 µl

Brand

Wasserbad, Typ W16

HGL Technik

Wärmeschüttler, SM-30

Edmund Bühler

Vortexer REAX top	Heidolph
Zentrifuge, Typ 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge, Typ 3 S-R	Heraeus-Multifuge

## 2.1. 2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten 5 ml, Costar <sup>®</sup> Stripette <sup>®</sup>	Corning Incorporated
Einmalpipetten 10 ml, Costar <sup>®</sup> Stripette <sup>®</sup>	Corning Incorporated
Einmalpipetten 50 ml, Costar <sup>®</sup> Stripette <sup>®</sup>	Corning Incorporated
Einmalspritzen Ecoject <sup>®</sup> 10 ml Luer, Dispomed <sup>®</sup>	Witt oHG
Einmaluntersuchungshandschuhe Diamond Grip Plus	Microflex
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml safe-lock	Eppendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml safe-lock	Eppendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml safe-lock	Eppendorf
Glasperlen 0,5 mm, acid washed	Biospec
Mikro-Schraubenröhrchen 2ml	Sarstedt
Mikrotiterplatte 96 Loch Flachboden	Greiner
Nitril-Handschuhe Nitra-Tex <sup>®</sup>	Ansell

Pipettenspitzen, blau, 1ml	Sarstedt
Pipettenspitzen, gelb, 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen, Standardtips, 10 µl	Sarstedt
Skalpell (22er Klinge )	TechnoCut
Spritzen-Filter Corning® 0,22 µm	Corning Incorporated
Spritzen-Filter Corning® 0,45 µm	Corning Incorporated
Steril-Filter Corning® 0,45 µm (Zellulose-Acetat)	Corning Incorporated
Steril-Filter Corning® 0,22 µm (Zellulose-Azetat)	Corning Incorporated
Zentrifugengefäße, 15 ml Falcons	Greiner
Zentrifugengefäße, 50 ml Falcons	Greiner

### 2.1.3 Chemikalien und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden verwendete Chemikalien von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Medien wurden von Becton-Dickinson (Sparks, USA) bezogen. Bezugfirmen der Enzyme sind jeweils im Text vermerkt.

### 2.1.4 *C. glabrata*-Stämme

Insgesamt wurden ein Kollektiv von zehn Laborstämmen und 124 klinische Isolate der Spezies *C. glabrata* untersucht.

Das Laborstamm-Kollektiv bestand aus klonalen Proben des Labor-Referenzstamms ATCC2001/CBS138 unterschiedlicher Herkunft (Tabelle 2). Die klinischen Isolate stammten größtenteils von klinisch auffälligen Patienten aus verschiedenen Einrichtungen Deutschlands, der Schweiz, Spaniens und der Tschechei (Tabelle 3).

**Tabelle 2: *C. glabrata*-Laborstämmen**

Stamm Nr.	Bezeichnung	Herkunft
1	ATCC2001/CBS138	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Belgien
2	ATCC2001/CBS138	Ag Weig, Göttingen, Deutschland
3	ATCC2001/CBS138	Ag Weig, Würzburg, Deutschland
4	ATCC2001/CBS138	Ag Mühlischlegel, Canterbury, England
5	ATCC2001/CBS138	Ag Kuchler, Strassburg, Frankreich
6	ATCC2001/CBS138	Ag Brown, Aberdeen, England
7	ATCC2001/CBS138	Ag Haynes, London, England
8	ATCC2001/CBS138	Ag Kuchler, Wien, Österreich
9	ATCC2001/CBS138	Ag Kuchler, Wien, Österreich
10	ATCC2001/CBS138	Ag Sanglard, Lausanne, Schweiz

Tabelle 3: Klinische *C. glabrata*-Isolate und Patientendaten

EU Stamm-Nr.	Herkunft	Geschlecht/ Alter	Primär- Erkrankung	Material
15	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Tracheal-Sekret
18	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	n.b.
19	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Vaginalabstrich
20	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	Atypische Pneumonie	Bronchial-Sekret
23	Uni Klinikum Rostock	w/16	n.b.	Blutkultur
24	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	n.b.
25	Charite Berlin	w/54	ARDS	Blutkultur
26	Charite Berlin	m/75	n.b.	Blutkultur
27	Charite Berlin	m/70	Z.n. Ileus	Blutkultur
28	Uni Klinikum Marburg	w/66	n.b.	Blutkultur
29	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	m/64	Z.n. Alkohol- intoxikation	Blutkultur
30	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	m/77	Peritonitis	Aszites-Punktat
31	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	m/77	Peritonitis	Blutkultur
32	Helios Kliniken Schwerin	m/64	n.b.	Blutkultur
33	Uni Klinikum Homburg Saar	m/64	Peritonitis	Peritoneal- flüssigkeit
34	Charite Berlin	m/69	n.b.	Blutkultur
35	Charite Berlin	m/66	n.b.	Blutkultur
36	Charite Berlin	w/80	Peritonitis	Aszites-Punktat

37	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	m/73	Peritonitis, Z.n. Anastomosens- insuffizienz	Bauchhöhle
38	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/56	Peritonitis, Pankreatitis	Blutkultur
39	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/56	Peritonitis, subabdominaler Abszess	Blutkultur
40	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/55	Septische Temperaturen	Blutkultur
41	Uni Klinikum Klinik	m/70	n.b.	Blutkultur
42	Medizinal Untersuchungs- amt Bochum	m/53	Z.n.Dünndarm- perforation	Blutkultur
43	Städtisches Krankenhaus Krefeld	w/58	n.b.	Blutkultur
44	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/89	Magen- perforation	Aszites-Punktat
45	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/84	n.b.	Blutkultur
46	Uni Klinikum Göttingen	w/35	ARDS	Blutkultur
48	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/16	Kniegelenks- empyem	Punktat
49	RKI Berlin	m/39	n.b.	Blutkultur
50	Charite Berlin	m/71	Z.n. Rektum-Ca	Blutkultur
52	Friedrich Löffler Institut Greifswald	m/88	n.b.	Blutkultur
53	Charite Berlin	w/62	n.b.	Blutkultur
54	LUA Sachsen/ Chemnitz	w/72	n.b.	Blutkultur
57	Uni Klinikum Magdeburg	m/75	V.a. Endokarditis	Blutkultur

58	Nieder-sächsisches Landesgesundheitsamt Hannover	w/82	n.b.	Blutkultur
59	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/59	n.b.	Blutkultur
60	Ev Krankenhaus Göttingen - Weende	m/74	n.b.	Aszites-Punktat
61	Labor Wagner Göttingen	w/84	n.b.	Blutkultur
62	Städtische Kliniken Ffm. Höchst	m/65	Urämie	Blutkultur
63	Uni Klinikum Göttingen	m/70	Unklares Fieber	Blutkultur
64	Uni Klinik Kiel	w/44	n.b.	Blutkultur
69	Uni Klinikum Göttingen		Pneumonie, Harnwegsinfekt, Diabetes mellitus	Urin
74	n.b.	n.b.	n.b.	Urin
83	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
84	n.b.	n.b.	Blutige Diarrhoe	ZVK-Spitze
85	Uni Klinikum Göttingen	w/71	n.b.	Blutkultur
86	Uni Klinikum Rostock	m/77	Niereninsuffizienz	Blutkultur
87	Uni Klinikum Rostock	w/66	Pneumokokken-Meningitis	Blutkultur
89	Uni Klinikum Mannheim	m/62	n.b.	Magensaft
90	Uni Klinikum Mannheim	w/7	n.b.	Magensaft
91	Charite Berlin	w/83	Z.n. Herz-OP	Blutkultur
92	Charite Berlin	m/73	Chron. Niereninsuffizienz	Blutkultur

93	Charite Berlin	m/46	Leberabszess, Pankreatitis	Blutkultur
94	UKG	w/78	Fieberhafter Infekt	Blutkultur
95	Helios Kliniken Schwerin	m/40	Hypoxischer Hirnschaden	Blutkultur
96	Charite Berlin	m/55	n.b.	Blutkultur
97	Charite Berlin	w/76	Z.n. Herz-OP	Blutkultur
99	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	w/84	Z.n. abdominaler OP	Galle
100	Krankenhaus Dresden Friedrichsstadt	m/83	n.b.	Blutkultur
101	Medizinal-Unter- suchungsamt, Bochum	m/3	Z.n. Kurzdarm- syndrom	Blutkultur
102	Städtische Kliniken Ffn. Höchst	m/80	n.b.	Blutkultur
103	Uni Klinikum Homburg Saar	w/45	n.b.	Blutkultur
104	Uni Klinikum Homburg Saar	w/77	Diabetes mellitus, Gangrän	Peritoneal- flüssigkeit
105	Max von Pettenkofer- Institut, Groß Hadern	m/52	n.b.	Blutkultur
107	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
152	Spanien	n.b.	n.b.	Sputum
161	Spanien	n.b.	n.b.	Oropharyngeal- Abstrich
162	Spanien	n.b.	n.b.	Oropharyngeal- Abstrich
167	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Sputum
181	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Drainageflüssig- keit Bauchraum



182	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	n.b.
184	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
188	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Oropharyngeal- Abstrich
213	Spanien	n.b.	n.b.	Oropharyngeal- Abstrich
216	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
226	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
227	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
228	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
229	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
230	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
231	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur

232	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
233	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
235	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne	n.b.	n.b.	Blutkultur
275	Comenius Universität Bratislava	w/39	n.b.	Vaginalabstrich
276	Comenius Universität Bratislava	w/44	n.b.	Vaginalabstrich
277	Comenius Universität Bratislava	w/42	n.b.	Vaginalabstrich
278	Comenius Universität Bratislava	w/20	n.b.	Vaginalabstrich
279	Comenius Universität Bratislava	w/n.b.	n.b.	Urin
280	Comenius Universität Bratislava	w/39	n.b.	Cervixabstrich
281	Comenius Universität Bratislava	w/39	n.b.	Vaginalabstrich
282	Comenius Universität Bratislava	w/59	n.b.	Vaginalabstrich
283	Comenius Universität Bratislava	w/22	n.b.	Vaginalabstrich
284	Comenius Universität Bratislava	w/21	n.b.	Vaginalabstrich

285	Comenius Universität Bratislava	w/n.b.	n.b.	Urin
286	Comenius Universität Bratislava	w/37	n.b.	Vaginalabstrich
340	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	ZVK-Spitze
341	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Stuhl
342	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	Fieber, Z.n. Aspiration	Rachenabstrich
343	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Urin
348	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Urin
357	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Urin
359	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Urin
362	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	Fieber, Z.n. Abort	Blutkultur
381	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	ZVK-Spitze
386	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Leisten-Punktat
387	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Blutkultur
388	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Blutkultur
390	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	n.b.
393	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	Urin
483	Spanien	n.b.	n.b.	ZVK-Spitze
871	Uni Klinikum Regensburg	m/67	Hämatolog. Malignom/HIV	Blutkultur.
879	Wedau Kliniken Duisburg	w/n.b.	n.b.	Aszites-Punktat

884	Uni Klinikum Mainz	w/61	CMV Hepatitis	n.b.
891	Helios Kliniken Schwerin	w/67	Hämatolog. Malignom, Multiorgan- versagen	n.b.
1009	Carl Thiem Klinikum Cottbus	w/69		Blutkultur
1010	Sächsische Landesunter- suchungsanstalt für Gesungheits- und Veterinär- medizin Dresden	m/45	Unklares Fieber	Blutkultur
1011	Uni Klinikum Kiel	m/51	n.b.	Blutkultur
1012	Uni Klinikum Mainz	m/76	n.b.	ZVK-Spitze
1013	Gemeinschafts- praxis Stein Mönchen- gladbach	m/84	n.b.	Blutkultur
1014	Uni Klinikum Mainz	m/73	n.b.	Blutkultur
1015	Uni Klinikum Münster	w/62	n.b.	Blutkultur
1016	Uni Klinikum Greifswald	m/61	n.b.	Blutkultur
1025	Uni Klinikum Göttingen	n.b.	n.b.	n.b.

m = männlich, w = weiblich, n.b. = nicht bekannt, Z.n. = Zustand nach

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *C. glabrata*

Für Flüssigkulturen von *C. glabrata* wurden die Zellen in YPD-Medium (2% Bactopecton, 1% Hefeextrakt, 2% Glucose) über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 30°C und 180-200 rpm kultiviert. Sabouraud-Agarplatten oder Sabouraud-Schrägagar-Röhrchen (0,5% Casiton, 0,5% Pepton, 2% Glucose, 2% Agar) mit *C. glabrata* wurden bei 30°C im Inkubator bebrütet.

### 2.2.2 Isolation genomischer DNA aus *C. glabrata*

*C. glabrata* Zellen aus 5 ml YPD-Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 x g bei 4°C geerntet, in 500 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und in ein 2 ml Schraubdeckel-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 14200 x g wurde der Überstand dekantiert, die Zellen mittels Vortexer in den verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und 200 µl Lysis-Mix (2% Triton X-100; 1% SDS; 0,1 M NaCl; 0,01 M Tris/HCl pH 8,0; 0,001 M EDTA) zugefügt. Zum Zellaufschluss wurden 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Gemisch und säuregewaschene Glasperlen zugegeben und zweimal in der FastPrep-Maschine für 20 sec auf Stufe 4,0 aufgeschlossen, wobei die Proben zwischendurch 5 min auf Eis gekühlt wurden. Nach Zugabe von 200 µl TE (10 mM Tris/HCl) pH 7,5 wurde 5 min bei 14200 x g zentrifugiert. Der wässrige, die DNA-enhaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden zwei Volumen 98%iges Ethanol zugegeben, durch Invertieren gemischt und die Proben über Nacht bei -20°C in den Gefrierschrank gestellt.

Anschließend wurde die DNA für 5 min bei 20000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pelett wurde in 400 µl TE mit 30 µg RNase A (Sigma Aldrich) resuspendiert, für 30 min bei 37°C unter Schütteln im Thermomixer inkubiert und danach abermals mit 98%igen Ethanol über Nacht bei -20°C im

Gefrierschrank gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14200 x g wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 100 µl TE pH 7,5 gelöst.

### 2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Visualisierung von genomischer DNA erfolgte in 0,8 - 1% (w / v) Agarosegelen mit anschließender Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad (2 mg/l). Die Gele wurden mit 1x TAE-Puffer pH 8,5 (40 mM Tris; 1% Essigsäure; 1mM EDTA) angesetzt. Dieser diente auch als Laufpuffer während der Elektrophorese. Die Proben wurden durch Zusatz eines 10x Ladepuffers (0,25% Bromphenolblau; 100 mM EDTA pH8; 20% Glycerol; 1% SDS; 0,25% Xylencyanol) auf die Elektrophorese vorbereitet. Zur Abschätzung der Größe und Menge der Fragmente wurde zusätzlich ein DNA-Marker (SMART-ladder; Eurogentec, Köln, Deutschland) aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-120 V für ca. 30 min. Durch UV-Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffs und DNA-Interkalators Ethidiumbromid konnten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Eine Quantifizierung der Emission konnte gegebenenfalls mit Hilfe des Computerprogramms ScanPack3 vorgenommen werden.

### 2.2.4 Calcofluor-Weiß-Tropftest

Die Empfindlichkeit gegenüber der wachstumshemmenden Substanz Calcofluor Weiß (Fluorescent brightener 28; Sigma) wurde auf YPD-Agarplatten (2% Bactopepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glucose, 2% Agar) mit 150 mM HEPES pH 7,5 bei einer Konzentration von 0,6 mg/ml überprüft.

Hierzu wurden *C. glabrata*-Zellen aus einer YPD-Übernachtskultur in frisches Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inokuliert und für zwei Stunden unter Schütteln bei 30°C inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von ~1 erreicht hatten. Die Zellen wurden gewaschen und zu einer Zelldichte von 1x10<sup>5</sup> Zellen/ml in YPD-Medium resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension weitere fünf Male im Verhältnis 1:5 verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde in einer Reihe 3 µl

auf die Agarplatte pipettiert und der Tropfen angetrocknet. Die Platten wurden 1-2 Tage bei 30°C im Inkubator bebrütet. Die CFW-Stocklösung wurde durch Lösen von 100 mg CFW in 1 ml 250 mM NaOH hergestellt.

## **2.2.5 Mikrodilutionstest mit den Antimykotika Caspofungin und Fluconazol**

### **2.2.5.1 Inokulum**

Die Präparation des Inokulums erfolgte gemäß den Leitlinien des CLSI-Protokolls M27 A2. Es wurden jeweils Reinkulturen verwendet, die bei 37°C inkubiert und nicht älter als 24 bis 48 Stunden waren.

### **Ausgangssuspension**

Mittels einer sterilen Impföse wurden je nach Koloniegröße drei bis fünf einzelne Kolonien in steriler Kochsalzlösung gelöst. Die Trübung wurde mit einem Densimat McFarland Photometer bestimmt. Für die verwendete Hefezell-Suspension wurde eine Standard-McFarland-Trübungsmessung von 0,3 eingestellt. Die Einsaat lag durch diese Methode bei  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Suspension.

### **Endverdünnung**

Die Ausgangssuspension wurde durch Zusatz von steriler Kochsalzlösung im Verhältnis 1:100 und anschließend mit RPMI Medium (10,43 g/l RPMI 1640 Medium mit L Glutamin, ohne  $\text{NaHCO}_3$ , 34,52 g/l MOPS, 0,2% Glucose) im Verhältnis von 1:20 weiter verdünnt. Das Inokulum hatte eine Endkonzentration von  $5 \times 10^2$  bis  $2,5 \times 10^3$  Zellen/ml. Es wurde unmittelbar nach der Herstellung zur Beschickung der Mikrotestplatten verwendet.

### 2.2.5.2 Etablierung der Qualitätskontrolle

Zur Etablierung der nötigen Standard-McFarland-Einstellungen und zur weiteren regelmäßigen stichprobenartigen Kontrolle der Einsaat wurde wie folgt vorgegangen:

Von der Zellsuspension einer Probe wurden zweimal 50µl entnommen und auf je einer Sabouraud Agar-Platte gleichmäßig verteilt. Nach 24 bis maximal 48 stündiger Bebrütung bei 37°C konnten die gewachsenen Einzelkolonien ausgezählt werden. Die mittlere Anzahl an koloniebildenden Einheiten ergab die Zahl der ursprünglich in den 50µl Inokulum gelösten Hefezellen. Sie wurde auf 1 ml hochgerechnet und mit der in den Leitlinien des CLSI empfohlenen Einsaat von  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter abgeglichen.

### 2.2.5.3 Beschickung der Mikrottestplatten

Die Beschickung der Mikrottestplatten erfolgte entsprechend der CLSI-Leitlinien. In den zwölf Positionen einer Reihe fanden sich als letztes die Wachstumskontrolle, dann die Konzentrationsstufen der Verdünnungsreihe beginnend mit der niedrigsten Antimykotikakonzentration und zuletzt die Sterilkontrolle. Ein *Candida*-Kontrollisolat, für welches die jeweilige MHK bekannt ist (Tabelle 2), wurde jeweils parallel auf zwei Reihen der Mikrottestplatte mitgeführt. Die getesteten Konzentrationsbereiche lagen für Fluconazol bei 0,25 - 128 µg/ml und für Caspofungin bei 0,0313 bis 16 µg/ml.

**Tabelle 4: MHK-Bereiche von zwei Referenzstämmen**

Stammbezeichnung	ATCC 6258 ( <i>C. krusei</i> )		ATCC 22019 ( <i>C. parapsilosis</i> )	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Inkubationsdauer	24 h	48 h	24 h	48 h
Caspofungin-MHK [µg/ml]	0,12 - 1,0	0,25 - 1,0	0,25 - 1,0	0,5 - 4,0
Fluconazol-MHK [µg/ml]	8 - 64	16 - 128	0,5 - 4,0	1,0 - 4,0

MHK = Minimale Hemmkonzentration

Die Mikrottestplatten durchliefen zwei Arbeitsgänge. Im Ersten wurden die Testplatten soweit mit RPMI-Medium und den Ansätzen der Verdünnungsreihen



der Antimykotika vorbereitet und bis zur Verwendung bei - 20°C eingefroren. Im Zweiten wurden die Platten mit Inokulum beimpft: Je nach Menge der zu testenden Stämme, wurde die benötigte Menge an gefrorenen Platten für ca. 45 min im 37°C Inkubator aufgetaut. Pro Stamm wurden jetzt 100 µl des zuvor gründlich durchmischten Inokulums mit einer Dispenser-Pipette mit steriler Spitze zuerst in den Positionen der zwölften Spalte und dann aufsteigend in die Positionen bis zur zweiten Spalte gegeben. Die Positionen der ersten Spalte blieben für die Sterilkontrolle unbeschickt. Nach diesem Schritt befanden sich in jeder Position der Mikrottestplatte 200 µl Flüssigkeit.

### **2.2.5.4 Inkubation**

Die Platten wurden in einer sterilen feuchten Kammer bei 37°C über 48 h inkubiert.

### **2.2.5.5 Ablesen der Ergebnisse**

Das Ablesen der Mikrottestplatten erfolgte zunächst makroskopisch zur Kontrolle des regelrechten Wachstums der Hefen. Jede Position wurde nach den Kategorien „kein sichtbares Wachstum“, „schwaches, sichtbares Wachstum“ und „deutlich, sichtbares Wachstum“ oder „Kontamination“ beurteilt. In einem vorgefertigten Ergebnisbogen wurden die Ableserresultate für die einzelnen Positionen genau festgehalten. Der Bogen wurde später mit den Ergebnissen der photometrischen Auswertung verglichen, um deren Plausibilität abzuschätzen und sie zu kontrollieren. Die makroskopische Auswertung diente jedoch nicht der Festlegung der minimalen Hemmkonzentration der einzelnen Stämme.

Hiezu wurde im zweiten Ablesevorgang das Wachstum in den einzelnen Positionen auf Basis von Trübungsmessungen bei einer Wellenlänge von 630 nm im automatischen Platten-Photometer gemessen. Die Sterilkontrolle diente als Nullabgleich.

Um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten musste jede Position eine möglichst homogene Zellsuspension enthalten. Dies wurde durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Achtkanalpipette und einem Satz steriler Spitzen

erreicht. Begonnen wurde in Spalte zwei und dann entsprechend des zunehmenden Wachstums bis zu Spalte zwölf. Nach Kontrolle auf und Beseitigung von störenden Bläschen konnte die Trübung der einzelnen Positionen bestimmt werden. Dann konnte der Mittelwert aus den Trübungswerten der sich entsprechenden Positionen des Doppelansatzes errechnet werden. Durch den Vergleich mit dem Mittelwert der entsprechenden Wachstumskontrolle konnte nun die minimale Hemmkonzentration der Antimykotika für jedes Isolat ermittelt werden.

Bei Caspofungin wurde die  $MHK_{80-90}$  abgelesen, entsprechend der Konzentration, bei der das Wachstum im Vergleich zur Wachstumskontrolle um mindestens 80% reduziert war, und für Fluconazol jeweils die  $MHK_{50}$ .

## **2.2.6 Mikrodilutionstest mit den wachstumshemmenden Substanzen Blancophor P und Kongorot**

Die Durchführung der Mikrodilutionstests erfolgte nach den unter 2.2.5 beschriebenen Kriterien. Allerdings wurde anstelle des RPMI-Mediums YPD (2% Bactopepton, 1% Hefeextrakt, 2% Glucose) + 150 mM Hepes pH 8,0 zur Herstellung der Verdünnungsreihen und zur Verdünnung des Inokulums verwendet.

Die getesteten Konzentrationsbereiche lagen für Blancophor P (Kemira, Leverkusen, Deutschland) bei 0,125 - 4 mg/ml und für Kongorot bei 0,125 - 100 µg/ml. Die Platten wurden im temperaturkontrollierten Inkubator für 48h bei 30°C bebrütet. Für beide Substanzen wurde die  $MHK_{80}$  abgelesen.

## **2.2.7 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) zur Quantifizierung von Zellwand-Kohlenhydraten**

### **2.2.7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (FACS, **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) ist eine Methode, mit der Fluoreszenz- und Streulichtsignale fokussierter Partikel oder Zellen in einem Flüssigkeitsstrom analysiert werden können. Als

monochromatische Lichtquelle wird ein fest fixierter Argonlaser mit einem Emissionsspektrum von 488 nm verwendet. Durch die Anregung von Zellen mittels Laserlicht können zum einen unterschiedliche Streulichteigenschaften, die durch Größe und Morphologie des jeweiligen Partikels determiniert sind, analysiert werden. Zum anderen können durch Markierung von bestimmten Strukturen mit fluoreszierenden Substanzen zusätzlich zu den Streulichteigenschaften die Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen detektiert werden. Aufgrund der hohen Messgeschwindigkeit ist es möglich, simultan die einzelnen Parameter von mehr als zehntausend Teilchen in weniger als einer Minute zu erfassen. Dabei sind sogar einzelne Partikel von einer Größe von weniger als 0,5  $\mu\text{m}$  unterscheidbar. Die Auswertung der Daten erfolgt über einen angeschlossenen Computer mit spezieller Software.

Die Grundvoraussetzung zur Messung mit einem Durchflusszytometer ist dabei das Vorliegen einer Probe in Einzelzellsuspension. Mittels Unterdruck wird die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen über eine Stahlkapillare in die Messküvette des Geräts eingesogen. Durch die starke Beschleunigung der Trägerflüssigkeit trennen sich eventuell vorhandene Zellaggregate auf, so dass Einzelzellen in einem konstanten Fluss durch den Laserstrahl detektiert werden können.

Bei Passage der Zellen durch den fokussierten Laserstrahl wird die Richtung, bzw. die Wellenlänge des Anregungslichts verändert. Das auf die Zellen fokussierte Licht wird dabei in ein Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter FSC) und in ein Seitwärtsstreulicht (Sidewardscatter SSC) aufgetrennt und von entsprechenden Sensoren erfasst. Die Vorwärtsstreuung ist dabei abhängig von der Zellgröße, die Seitwärtsstreuung durch entsprechende morphologische Eigenschaften der Zellen, wie z.B. die Granularität und Membraneigenschaften.

Werden nun Strukturen auf der Zelloberfläche mit entsprechenden fluoreszierenden Substanzen markiert, absorbieren diese das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht charakteristischer Wellenlänge. Dieses wird durch entsprechende Filter geleitet und elektronisch verstärkt. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der markierten

Bindungsstellen auf der Zelloberfläche. Das Fluoreszenzsignal ist umso stärker, je mehr fluoreszierender Farbstoff auf der Zelloberfläche gebunden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit AlexaFluor® 488-konjugiertes Weizenkeim-Agglutinin und Kongorot zum Anfärben der Zellwandpolymere Chitin und  $\beta$ -1,3- Glukan verwendet.

Um während der Detektion störende Zellfragmente von den zu untersuchenden Zellen trennen zu können, wird ein Schwellenwert über den Forwardscatter gelegt, so dass Partikel unterhalb einer bestimmten Größe nicht erfasst werden. Die Signale können sowohl im linearen, als auch im logarithmischen Modus verstärkt werden.

Letzterer findet vor allem bei Parametern Anwendung, die einen größeren Empfindlichkeitsbereich erfordern, wie beispielsweise das Erfassen von eher kleineren Zellen und Partikeln.

Zur Unterscheidung einzelner Zellpopulationen bedient man sich in der Regel der zwei Parameter Darstellung von Forwardscatter zu Sidewardscatter in Form eines Dot Plots.

Für die Auswertung der Parameteruntersuchungen wurde in dieser Arbeit auf die Einparameterdarstellung mittels eines Histogramms zurückgegriffen, bei dem die Anzahl der Zellen (Counts) auf der Ordinate gegen die Kanäle, bzw. die gemessene Fluoreszenzintensität, (FLH) auf der Abszisse aufgetragen wurde.

Für die statistische Auswertung der untersuchten Parameter wurde der Median (geometrisches Mittel) der Signalintensität gewählt. Der Median entspricht dabei der Verteilungsklasse, bei der 50% der Werteverteilung darüber und 50% darunter liegen. Er eignet sich vor allem deshalb zur Abschätzung eines Signalwertes einer Zellpopulation, da er von Ausreißern, wie sie beispielsweise durch Artefakte wie Zellfragmente und Zellaggregate entstehen können, am wenigsten beeinflusst wird. In der Regel wurden in dieser Arbeit aus einer Kultur beide Parameter bestimmt. Es wurde dafür das geometrische Mittel der jeweiligen Fluoreszenz aus 12500 Einzelmessungen errechnet.

### 2.2.7.2 Quantitative Analyse des Chitin- und Glukan-Gehalts der Zellwand

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden *C. glabrata*-Zellen entweder in 5 ml YPD oder auf Sabouraud-Agar über Nacht bei 30°C kultiviert. 500 µl Flüssigkultur und ein einem Volumen von 50 µl entsprechendes, in 1 ml bidestilliertem Wasser aufgenommenes Pellet von der Agar-Platte wurden in jeweils ein 1,5 ml safelock-Eppendorf-Gefäß überführt.

Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 5400 x g bei 22°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen.

Für die Chitinanalyse wurde das Pellet in 1 ml 1 M HCl, für die Glukananalyse in 1ml 1 M NaOH aufgenommen und für 5 min bei 95°C unter Schütteln gekocht. Nach dreiminütigem Abzentrifugieren bei 8400 x g rpm bei 22 °C folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen in 1 x PBS pH 7,4.

Nun wurden die Zellen entweder in 300 µl Alexa Fluor®488-konjugierter Weizen-Keim-Agglutinin-Färbelösung (50µg/ml PBS pH 7,4, Chitin-Färbung) oder in 300 µl Kongorot-Färbelösung (200mg/ml H<sub>2</sub>O, Glukan-Färbung) aufgenommen und unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Abzentrifugieren für 3 min bei 8400 x g bei 22°C wurden die Zellen in 500 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Die Zellen wurden nun 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und zur weiteren Analyse in einem FACS-Calibur-Durchflusszytometer in ein entsprechendes Probenröhrchen überführt.

## 2.2.8 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

### 2.2.8.1 Prinzip der PFGE

In dieser Arbeit wurden die Karyotypen verschiedener *C. glabrata*-Isolate auf chromosomale Veränderungen mittels elektrophoretischer Auftrennung untersucht. Mit einer Größe zwischen 485 bis 2300 kb sind diese Chromosomen zu groß, um mittels konventioneller Agarosegelelektrophorese aufgetrennt zu werden, welche auf der Separation von DNA-Fragmenten nach

dem sogenannten Molekularsiebeffekt beruht. Dies bedeutet, dass große DNA-Moleküle langsamer durch die Poren des dreidimensionalen Gitternetzes der Agarosematrix wandern als kleinere. Die Trennschärfe dieser Methode ist aber ab einer Größe von ca. 20 kb unbefriedigend, da größere DNA-Moleküle über eine ähnliche elektrophoretische Beweglichkeit verfügen und sich somit nicht separiert darstellen lassen.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese erlaubt dagegen auch die Auftrennung von Fragmenten oberhalb dieser Grenze. Das Prinzip hierbei beruht auf einer regelmäßigen Richtungsänderung des elektrischen Feldes um einen Winkel von 120°. Somit müssen sich die Fragmente immer wieder neu in Feldrichtung ihrer Längsachse nach ausrichten. Der Zeitbedarf der Auftrennung hängt dabei von der Größe des jeweiligen Fragments ab.

Auch wenn dieser Zeitbedarf mitunter gering ist, summiert er sich der Zahl der Richtungsänderungen entsprechend und ermöglicht somit die Separation sehr großer Fragmente.

Da chromosomale DNA eine Länge bis im Millimeter- und sogar Zentimeterbereich bei einer Breite von nur wenigen Nanometern besitzen kann, ist sie überaus anfällig gegenüber Scherkräften, wie sie bereits beim Pipettieren und Schütteln entstehen. Daher bettet man die Zellen zum Schutz vorher in Agaroseblöcke, um sie dann enzymatisch aufzuschließen und zu deproteinieren (MÜHLHARDT, 2003).

#### **2.2.8.2 Präparation von in Agarose eingebetteter Hefe-DNA**

*C. glabrata*-Zellen wurden in 5 ml YPD-Flüssigmedium im Schüttler bei 30°C über Nacht kultiviert. Anschließend wurde ein Milliliter der Flüssigkultur in bidestilliertem H<sub>2</sub>O resuspendiert und die Trübung mit einem Densimat-McFarland-Photometer bestimmt. Durch Zugabe von mehr Hefezellen oder Verdünnung mit mehr bidestilliertem H<sub>2</sub>O wurde eine Standard McFarland-Trübungsmessung von 4,0 eingestellt, entsprechend  $7 \times 10^8$  Zellen pro Milliliter Suspension. 14 ml dieser Suspension wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 4000 x g, bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl bidestilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und im Thermoblock auf 50°C äquilibriert.

Parallel dazu wurde voralliquotierte 2%ige in 2 x TAE gelöste Agarose für zwanzig Minuten bei 100°C im Wärmeblock aufgekocht und dann ebenfalls auf 50°C equilibriert. Nach Zugabe von 20 µl Zymolyase-Lösung (10 mM Tris, pH 7,2, 50 mM EDTA, 100 mg/ml Zymolyase 20T (Medac, Wedel, Deutschland)) wurde die Zellsuspension unmittelbar mit 50°C warmer, 2%iger Agarose versetzt und mittels einer Pipette in die dafür vorgesehene Gießform gebracht. 400 µl ergeben dabei genau zwei Agaroseblöcke, aus dem sich durch Zerschneiden sogenannte Inserts (= Teile des Agarose-Blocks, die letztlich zur elektrophoretischen Auftrennung in die Spuren des Agarosegels geladen werden) ergeben.

Die Gießform enthält insgesamt zehn Mulden, so dass zehn Isolate bei einem Gießvorgang aufgearbeitet werden können.

Die Agarose-Blöcke gelieren für 15 min bei 4°C und werden danach mittels eines Skalpell oder eines Rührspatels aus der Mulde in ein frisches Probengefäß (Sarstedt) mit vorgelegten 5 ml Zymolyase-Puffer überführt, mit 50 µl Zymolyase-Stammlösung versetzt und zur Degradation der Zellwand über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird der Zymolyase-Puffer entfernt und die Agaroseblöcke mit 5 ml Waschpuffer (20 mM Tris, pH 8,0; 50mM EDTA) für 30 min gewaschen. Nach Abnehmen des Waschpuffers wird mit einer Pasteurpipette jeweils 5 ml Proteinase K-Reaktionspuffer (100 mM EDTA, pH 8,0, 0,2% Natrium Deoxycholat, 1% Natrium Lauryl Sarcosin, 1 mg/ml Proteinase K) zu den Agaroseblöcken hinzugegeben. Es folgt eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln.

Danach wird der Puffer verworfen, die Inserts viermal für mindestens 30 min mit Wasch-Puffer gewaschen und anschließend in TE-Puffer bei 4°C bis zu maximal 6 Monaten gelagert.

### **2.2.8.3 Durchführung der PFGE mit dem CHEF-DR-II-System**

Zur Vorbereitung des CHEF-DR-II-Systems für einen Elektrophorese-Lauf werden zunächst 2 l 1 x TAE in die Elektrophoresekammer gegossen. Der Thermostat wird auf 2°C eingestellt und die Umwälzpumpe angeschaltet. Diese Konfiguration des Kühlsystems bewirkt, dass sich die Temperatur des Laufpuffers nach 1-2 h Vorkühlzeit auf eine konstante Lauftemperatur von 14°C

einstellt. Die Temperatur wird vor Laufbeginn mit einem Quecksilberthermometer kontrolliert.

Zur Herstellung eines Agarosegels werden 1,2 g Agarose in einen 200 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben, mit 120 ml 1 x TAE aufgeschwemmt und in einer Mikrowelle aufgekocht, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind. Nach dem Lösen der Agarose wird sie in einem Wasserbad auf 60°C temperiert und schließlich in den auf dem Nivelliertisch ausgerichteten und mit einem 10-zähligen Kamm versehenen Gießstand gegossen. Etwa 5 ml Agarose werden zurückgelassen, die im Wasserbad zur weiteren Verwendung flüssig gehalten werden. Das Gel geliert für 30 min bei Raumtemperatur. Der Kamm wird nun vorsichtig entfernt. Mittels eines sterilen Spatels werden die Agaroseblöcke aus dem mit Puffer befüllten Probengefäßen vorsichtig auf eine sterile Petrischale überführt und anschließend mit einem Skalpell ein der Geltaschengröße entsprechendes Insert zugeschnitten. Das Insert wird nun mit Hilfe des Spatels und des Skalpells in die Geltasche transportiert. Der verbleibende Agaroseblock wird unter TE-Puffer bei 4°C weitergelagert. Nach dem Beladen des Gels mit den Inserts und mindestens einem Referenzmarker werden Pufferreste vorsichtig aus den Taschen herauspipettiert, ohne die Inserts zu beschädigen. Um eine einheitliche Startlinie zu gewährleisten werden die Inserts an der vorderen Innenseite der Tasche platziert, so dass sie haften bleiben. Das Leervolumen der Auftragschale wird mit der Restagarose mittels einer Pipette möglichst luftblasenfrei aufgefüllt.

Sobald die Agarose geliert ist, wird das Gel mitsamt der schwarzen Platte auf den Boden der Gelkammer in die dafür vorgesehene Passform gedrückt. Der Fluß des Laufpuffers wird soweit reguliert, dass nur noch leichte Bewegungen der Oberfläche zu erkennen sind. Somit wird vermieden, dass das Gel durch den Pufferstrom die Adhäsion zur Unterlage verliert und abschwimmt. Das Gel wird 15 min auf 14°C durchgekühlt. Die Laufparameter lauten: Pulszeit A 60 s, Pulszeit B 120 s, Ratio 1, Laufzeit 22 h bei 200 V. Am Ende des Laufs wird das Gel in eine Färbeschale mit 250 ml deionisiertem H<sub>2</sub>O und 50 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) gelegt und die DNA für 30 min gefärbt. Das Gel wird mindestens 30 min mit deionisiertem H<sub>2</sub>O entfärbt und unter UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) mit der Kamera der Geldokumentation Biodoc fotografiert.



## 2.2.9 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

### 2.2.9.1 Prinzip des MLST

Das Multilokus-Sequenztypisierung Verfahren ist eine Methode zur molekularen Typisierung mikrobieller Organismen anhand von Sequenzanalysen von Haushaltsgenen. Die für die Analyse benötigten Genabschnitte werden via PCR amplifiziert und nachfolgend in einer Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Die Differenzierung von unterschiedlichen Isolaten einer Spezies erfolgt anhand von Unterschieden in der Abfolge der Nukleinsäuresequenz. In der Regel wird dabei eine Sequenz von durchschnittlich 450 Basenpaaren Länge untersucht und ein Allelprofil erstellt. Unterschiedliche Sequenzen eines Gens werden dabei als Allele dieses Gens bezeichnet.

Nach Abgleich mit allen zuvor für diesen Genlocus identifizierten Sequenzen wird dem jeweiligen Allel eine Nummer für diesen Locus zugeordnet. Ein Allelprofil eines Stammes setzt sich somit aus den Allelnummern aller sechs Genloki zusammen. Diesen Allelprofilen wird wiederum ein bestimmter Sequenztyp (ST) zugeordnet, der ebenfalls entsprechend durchnummeriert wird. Je größer die Ähnlichkeit der Allelprofile von Isolaten einer Spezies untereinander ist, umso näher sind sie miteinander verwandt (MAIDEN *et al.*, 1998; SPRATT, 1999).

Mittlerweile existieren MLST-Datenbanken für diverse Bakterien- und Pilz-Spezies, die eine schnelle Charakterisierung, sowie phylogenetische und populationsgenetische Analysen ermöglichen (ENRIGHT *et al.*, 2002; BOUGNOUX *et al.*, 2002). Für *C. glabrata* werden 6 Gene (*FKS*, *LEU2*, *NMT1*, *TRP1*, *UGP1*, und *URA3*) analysiert (DODGSON *et al.*, 2003).

## **2.2.9.2 Auswertung der Sequenzen**

### **2.2.9.2.1 Multiples Alignment**

Beim multiplen Alignment handelt es sich um das Anordnen und gleichzeitige Analysieren mehrerer Sequenzen.

Die bearbeiteten Sequenzen werden miteinander verknüpft, indem das Programm nach Sequenz-Blöcken größtmöglicher Übereinstimmung sucht und diese Blöcke mit möglichst wenigen Lücken untereinander ausgibt. Auf diese Weise können die Sequenzen miteinander verglichen werden, um unter anderem den Grad der Verwandtschaft zueinander zu ermitteln.

Das Alignment erfolgte mittels der Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software, Version 4.0 (Tamura, Dudley, Nei, und Kumar 2007), mit den dort voreingestellten Parametern. Für das Erstellen phylogenetischer Bäume wurden die untereinander ausgerichteten Sequenzen am Anfang und am Ende auf die gleiche Länge angepasst.

### **2.2.9.2.2 Phylogenetische Bäume**

Durch das Erstellen phylogenetischer Bäume wird versucht, die evolutionären Beziehungen zwischen Organismen aufzuzeigen (HANSEN, 2001). Die Lage der Organismen zueinander sowie die Astlänge der phylogenetischen Bäume zwischen den Organismen sind Indikatoren ihrer Verwandtschaftsbeziehungen. Es gibt verschiedene Methoden zur Berechnung phylogenetischer Bäume. Dazu gehören vor allem Distanzmethoden (z.B. Neighbor-Joining; UPGMA), Parsimonymethoden (Maximum Parsimony) und Maximum-Likelihood-Methoden.

### **2.2.9.2.3 Distanzmethoden**

Bei den Distanzmethoden werden evolutionäre Distanzen durch den schrittweisen Vergleich von Sequenzen berechnet und eine entsprechende Distanzmatrix erstellt, mit deren Hilfe anschließend der Baum berechnet wird.

Eine häufige Baumerstellungsmethode ist die von Saitou und Nei (1987) entwickelte Neighbor-Joining-Methode.

Bei dieser Methode wird zuerst eine sternenförmige Topologie angelegt und von dieser ausgehend durch Vergleich der Ähnlichkeit der Sequenzen der Baum erstellt. Dabei werden paarweise Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einem Ast des Baumes vereinigt. Daraufhin werden die Distanzen neu berechnet und die nächstverwandten wieder zu einem Ast zusammengefügt. Dies wird solange wiederholt, bis sich die sternenförmige Topologie völlig aufgelöst und alle untersuchten Taxa in den Baum eingefügt sind.

#### **2.2.9.2.4 Bootstrapping**

Beim Bootstrapping wird beliebig oft ein neues multiples Alignment erzeugt (zum Beispiel bei einem Bootstrap-Wert von 1000, wird der Datensatz 1000 mal neu kombiniert) und der Baum jedes Mal neu berechnet. So wird die Reihenfolge der Sequenzen im Alignment verändert oder aber die Positionen der Nukleotide innerhalb des Alignments für alle Sequenzen gleichzeitig verändert. Je öfter der gleiche Baum dabei gebildet wird, desto höher ist die statistische Signifikanz des Baumes (HANSEN, 2001; HOLMES, 2003).

Der phylogenetische Baum dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Nukleinsäuresequenzen erstellt. Hierbei wurde die Neighbor-Joining-Methode mit Bootstrap-Werten von 1000 verwendet. Dieser Algorithmus bietet den Vorteil, dass er auf sehr große Datensätze anwendbar ist, wo andere Methoden der phylogenetischen Analyse nicht mehr durchführbar sind. Desweiteren wird berücksichtigt, dass die Evolutionsgeschwindigkeit nicht konstant ist. Ein weiter von den anderen entferntes Taxon bedeutet somit nicht zwangsläufig einen entfernteren Verwandtschaftsgrad, sondern lässt sich auf beschleunigte Evolution zurückführen.

Die für die Sequenzierung benötigte genomische *C. glabrata*-DNA wurde mittels mechanischer Disruption der Zellen und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen. Die Amplifizierung der Sequenzen und die anschließende Durchführung der Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit Frau M.D.

Jacobsen und Frau K. Lee aus der Arbeitsgruppe von Professor Frank C. Odds der Universität Aberdeen vorgenommen.

Die abschließende Auswertung der Sequenzdaten und das Generieren des Dendrogramms erfolgte mit Hilfe der Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 (Tamura, Dudley, Nei, und Kumar 2007).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung des Laborstamm-Kollektivs

Ein Kollektiv zehn verschiedener klonaler Proben des *C. glabrata*-Referenzstammes ATCC2001/CBS138, die aus unterschiedlichen Laboratorien der Universitäten Aberdeen (CBS138/6), Canterbury (CBS138/4), Göttingen (CBS138/2), Lausanne (CBS138/10), London (CBS138/7), Strassburg (CBS138/5), Wien (CBS138/8 und CBS138/9), Würzburg (CBS138/3), sowie dem Centraalbureau voor Schimmelcultures in Utrecht (CBS138/1) stammten, sollten phänotypisch, Zellwand-biochemisch und karyotypisch charakterisiert werden.

Dass es sich bei den Proben um isogene Stämme handelt, wurde bereits durch Sequenztypisierung („*multilocus sequence typing*“ (MLST), DODGSON *et al.*, 2003) gezeigt (BADER, persönliche Mitteilung).

#### 3.1.1 Phänotypische Charakterisierung der Laborstämme

##### **Isogene *C. glabrata*-Laborstämme zeigen unterschiedliche Phänotypen gegenüber Zellwand-destabilisierenden und antimykotischen Substanzen**

Mittels Mikrodilutionstest wurde zunächst überprüft, ob die isogenen Laborstämme Unterschiede in der Wachstumshemmung durch ausgewählte Zellwand-destabilisierende Substanzen, sowie klinisch bedeutende Antimykotika zeigen.

Die zur Stoffgruppe der Diaminostilbene gehörenden Fluoreszenz-Farbstoffe Calcofluor Weiß und Blankophor P wirken über eine Bindung an naszierende Chitinketten in der pilzlichen Zellwand wachstumshemmend, der Azofarbstoff Kongorot hingegen über eine Bindung an  $\beta$ -1,3-Glukan. Das Echinocandin Caspofungin entfaltet seine antimykotische Wirkung über die Hemmung der  $\beta$ -1,3-Glukansynthese. Das Triazolderivat Fluconazol wirkt über die Inhibition der Synthese des Plasmamembran-Bestandteils Ergosterol fungistatisch.

In der Tat unterschieden sich die Stämme in der Empfindlichkeit gegenüber allen getesteten Substanzen. Anhand des Wachstumsverhaltens im Calcofluor-Weiß-Tropftest (Abbildung 8) und in standardisierten Mikrodilutionstests auf die Substanzen Blancophor P, Kongorot, Caspofungin und Fluconazol konnte eine Einteilung in drei Phänotypgruppen vorgenommen werden (Tabelle 5):

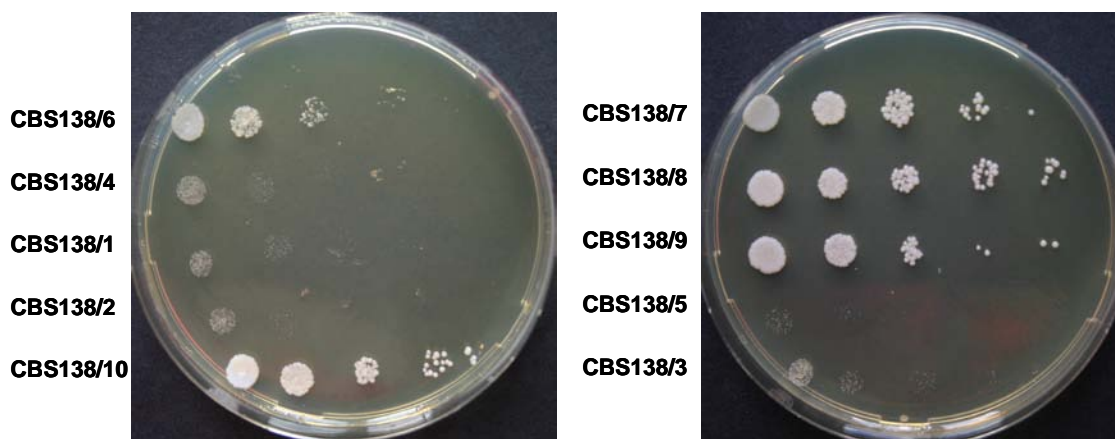
Die Stämme CBS138/1-5 zeigten gegenüber allen Substanzen ein signifikant reduziertes Wachstum, entsprechend der Phänotypgruppe 1.

Der Stamm CBS138/6 zeigte ein intermediäres Wachstumsverhalten gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen und eine verglichen mit der Phänotypgruppe 1 erhöhte Toleranz gegenüber den getesteten Antimykotika. Dieser Stamm bildet die Phänotypgruppe 2.

Die Phänotypgruppe 3, bestehend aus den Stämmen CBS138/7-10, zeigte gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen die geringste Wachstumshemmung und eine ähnliche Antimykotika-Toleranz wie die Phänotypgruppe 2.

Somit besaßen die Phänotypgruppen 2 und 3 eine gegenüber der Phänotypgruppe 1 signifikant erhöhte Toleranz gegenüber Zellwand-destabilisierenden und antimykotischen Substanzen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Suszeptibilitäten der Laborstämme gegenüber Blancophor P und Kongorot, sowie gegenüber den Antimykotika Caspofungin und Fluconazol, in einer linearen Abhängigkeit zueinander standen (Abbildung 9).



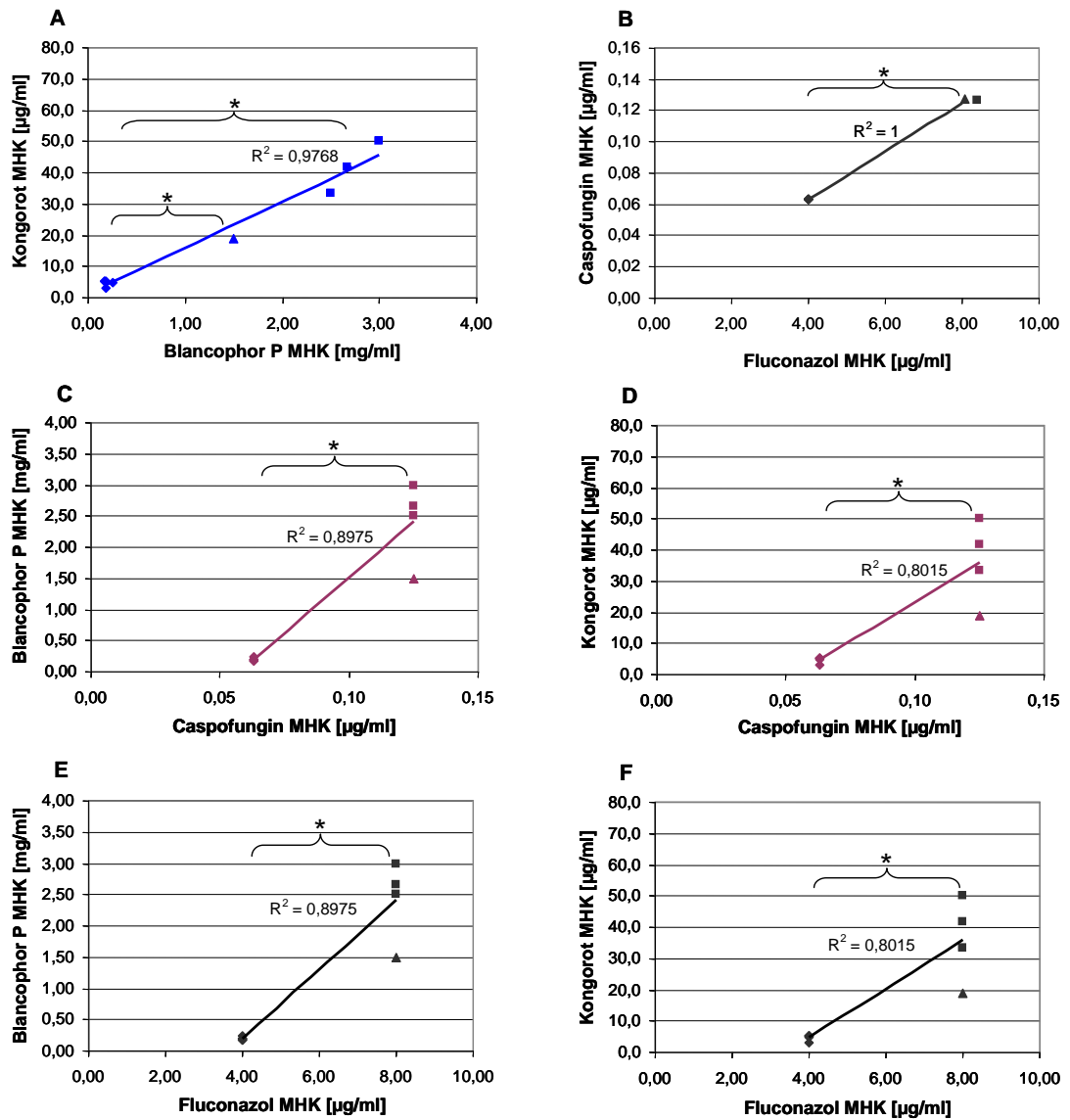
**Abbildung 8: Calcofluor-Weiß-Tropftest mit zehn Klonen des Labor-Referenzstamms CBS138 auf YPD Agar bei pH 8 und einer Wachstumstemperatur von 30°C**

Die Stämme CBS138/1-5 zeigten bei der getesteten Konzentration von 600 µg/ml CFW lediglich schwaches Wachstum (-). Der Stamm CBS138/6 zeigte mittelstarkes Wachstum (i), die Stämme CBS138/7-10 hingegen starkes Wachstum (+).

**Tabelle 5: Wachstumsverhalten der isogenen Laborstämme gegenüber Zellwanddestabilisierenden und antimykotischen Substanzen**

Stamm	Phänotypgruppe	CFW [0,6 mg/ml]	BP MHK <sub>80</sub> [mg/ml]	KR MHK <sub>80</sub> [µg/ml]	CS MHK <sub>80</sub> [µg/ml]	FL MHK <sub>50</sub> [µg/ml]
CBS138/1	1	-	0,19	3,13	0,063	4,0
CBS138/2	1	-	0,25	4,69	0,063	4,0
CBS138/3	1	-	0,17	5,20	0,063	4,0
CBS138/4	1	-	0,19	5,20	0,063	4,0
CBS138/5	1	-	0,17	5,20	0,063	4,0
CBS138/6	2	i	1,50	18,75	0,125	8,0
CBS138/7	3	+	3,00	50,00	0,125	8,0
CBS138/8	3	+	2,50	33,33	0,125	8,0
CBS138/9	3	+	2,70	41,60	0,125	8,0
CBS138/10	3	+	2,70	41,60	0,125	8,0

(-) = schwaches Wachstum im Tropftest, (i) = intermediäres Wachstum im Tropftest, (+) = starkes Wachstum im Tropftest, MHK = Minimale Hemmkonzentration gegenüber der jeweiligen getesteten wachstumshemmenden Substanz im Mikrodilutionstest auf der Mikrotiterplatte. Aufgeführt sind die Mittelwerte von mindestens drei biologisch voneinander unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 9: Korrelation der unterschiedlichen Phänotypen gegenüber Zellwanddestabilisierenden und antimykotischen Substanzen**

◆ = Phänotypgruppe 1, ▲ = Phänotypgruppe 2, ■ = Phänotypgruppe 3

Signifikante Unterschiede im Toleranzverhalten zwischen den Phänotypgruppen sind durch eine Klammer mit Sternchen-Symbol dargestellt.



### **3.1.2 Quantitative Analyse der Zellwandzusammensetzung ausgewählter Laborstämme mittels Durchflusszytometrie (FACS)**

Die beobachteten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Laborstämme gegenüber zellwandwirksamen Substanzen und Antimykotika gaben Anlass zu der Hypothese, dass Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung bezüglich des Chitin- und Glukangehalts ursächlich für die beobachteten Phänotypen sein könnten. Die Stämme CBS138/1, CBS138/6 und CBS138/7 wurden daraufhin als repräsentative Stämme der drei Phänotypgruppen ausgewählt, um deren Zellwandpolymergehalt mittels FACS quantitativ zu bestimmen.

Der Polymergehalt der Zellwand von Hefen ist abhängig von den Kultivierungsmodalitäten, der Wachstumsphase und des Zellzyklus und kann mitunter beträchtlich variieren (AGUILAR-USCANGA und FRANCOIS, 2003; DE GROOT et al., 2008). Um ähnliche Bedingungen zu schaffen, wie sie die Zellen bei der Kultivierung und während der 48stündigen Inkubation auf der Mikrotiterplatte beim Mikrodilutionstest durchlaufen, wurden sowohl Zellen der stationären Wachstumsphase von YPD-Flüssigkultur und von Sabouraud-Agar-Platte, als auch Zellen der logarithmischen Wachstumsphase einer YPD-Flüssigkultur mit Kongorot (bindet an 1,3- $\beta$ -Glukan) und AlexaFluor®-488-konjugiertem Weizenkeim-Agglutinin (bindet an das N - Acetylglucosamin des Chitins) angefärbt und der Gehalt des jeweiligen Polymers mittels FACS quantifiziert. Die gemessene Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zu dem jeweiligen Polymergehalt der Zellen. Da die Fluoreszenz eine dimensionslose Größe ist, wurde im Rahmen der hier durchgeführten Messungen die Fluoreszenz-Einheit "FE" eingeführt und bei komparativ-deskriptiven Analysen verwandt.

#### **3.1.2.1 Quantitative Analyse des Glukangehalts**

Bei der Bestimmung des Glukangehalts zeigte sich, dass Zellwände von Zellen der logarithmischen Phase generell über den höchsten Glukangehalt verfügten, gefolgt von Zellen in stationärer Phase einer Flüssigkultur. Zellen, die direkt von

der Agar-Platte entnommen wurden, besaßen generell den geringsten Glukangehalt.

Der Stamm CBS138/1 verfügte dabei sowohl in beiden stationären, als auch in der logarithmischen Phase jeweils über den höchsten Gehalt an Glukan. Der Stamm CBS138/6 besaß in der stationären Phase jeweils einen höheren Glukangehalt als der Stamm CBS138/7. Im Unterschied dazu besaß der Stamm CBS138/7 in der logarithmischen Phase einen höheren Glukangehalt als der Stamm CBS138/6 (Abbildung 10 A). Allerdings fand sich lediglich in der stationären Phase der Flüssigkultur ein signifikanter Unterschied im Glukangehalt der beiden Stämme CBS138/6 und CBS138/7.

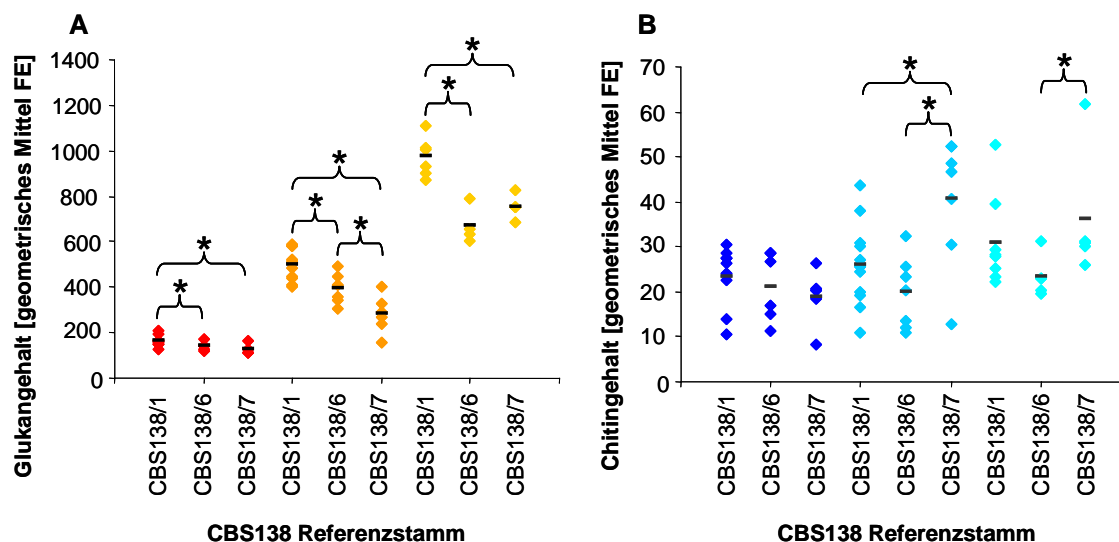
Somit verfügten die beiden Klone CBS138/6 und CBS138/7 in verschiedenen Wachstumsphasen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen über einen signifikant niedrigeren Glukangehalt als der Referenzstamm CBS138/1.

### **3.1.2.2 Quantitative Analyse des Chitingehalts**

Wie schon für den Glukangehalt beobachtet, war auch der Chitingehalt in Zellwänden von Zellen, die direkt von Agar-Platte entnommen wurden, am niedrigsten. Beim Vergleich von Zellen der stationären und der logarithmischen Wachstumsphase aus Flüssigkultur fiel jedoch auf, dass der Chitingehalt der Stämme CBS138/1 und CBS138/6 fast gleich hoch war, im Falle des CBS138/7 Stammes lag er sogar in der stationären Phase der Flüssigkultur am höchsten (Abbildung 10 B). Beim Vergleich des Chitingehalts der Zellwände innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsphasen zeigte der Stamm CBS138/6 in allen Phasen einen tendenziell geringeren Chitingehalt als der Stamm CBS138/1, sowie bei den Messungen aus den Flüssigkulturen einen signifikant niedrigeren Chitingehalt als der Stamm CBS138/7. CBS138/7 besaß hingegen bei den Messungen aus den Flüssigkulturen jeweils einen höheren Chitingehalt als der Stamm CBS138/1, der jedoch lediglich in der stationären Phase signifikant ausfiel. Bei Zellwänden von Zellen, die direkt von Agar-Platte entnommen wurden, bestand kein signifikanter Unterschied im Chitingehalt.

Somit verfügte der Stamm CBS138/7 sowohl in der stationären, als auch in der logarithmischen Phase einer YPD-Flüssigkultur tendenziell über den höchsten

Zellwand-Chitingehalt aller hier quantifizierten Laborstämme. Allerdings ist zu bemerken, dass bei der Analyse des Chitingehalts sich im Vergleich zur Bestimmung des Glukangehalts eine deutliche größere Streuung der einzelnen Messwerte zeigte.



**Abbildung 10: Quantitative FACS-Analyse des Glukan- (A) und Chitingehalts (B) drei ausgewählter Laborstämme in verschiedenen Wachstumsphasen**

Signifikante Unterschiede im Polymergehalt zwischen den Stämmen sind durch eine Klammer mit Sternchen-Symbol dargestellt.

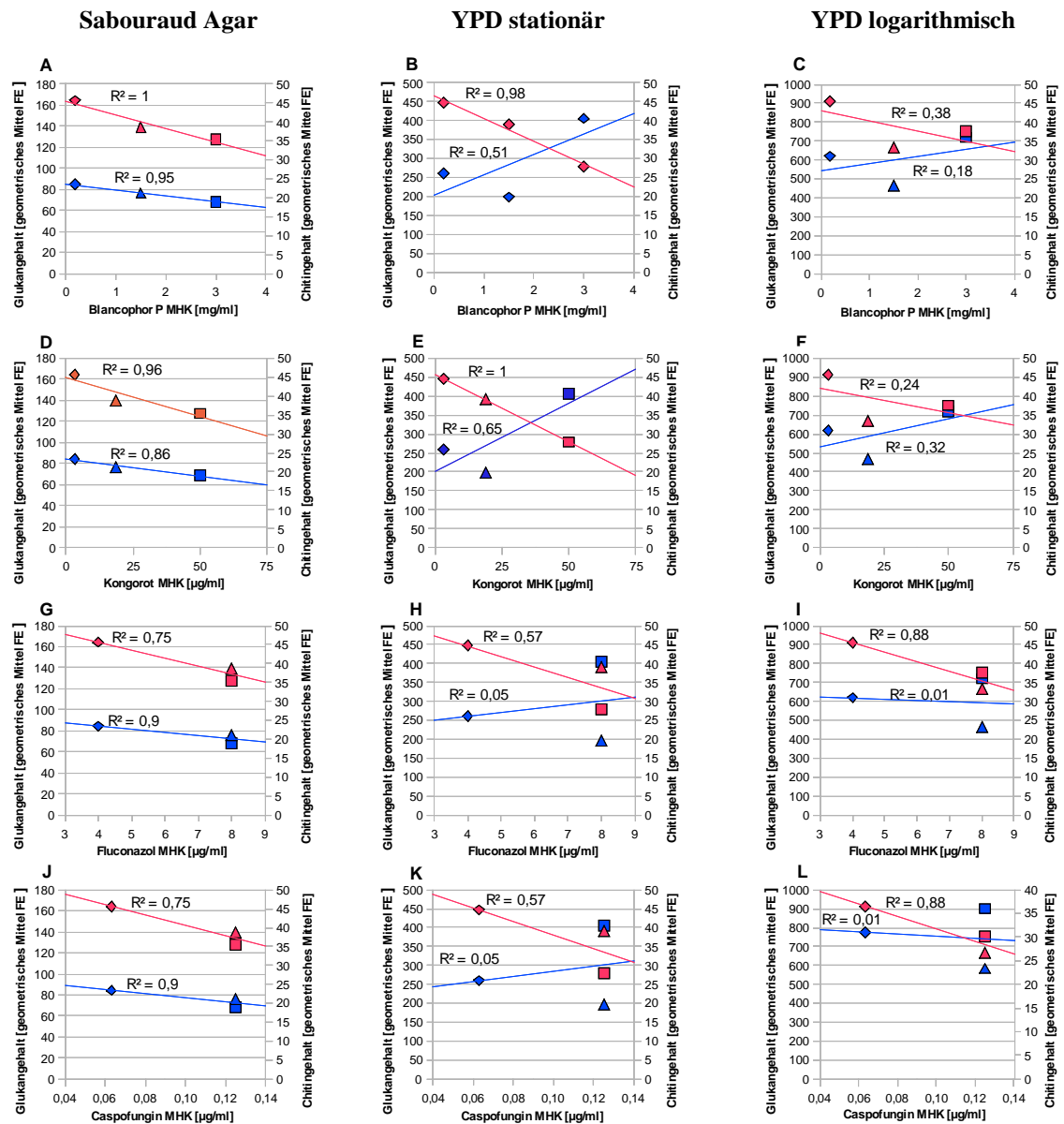
- ◆ / ◆ = Glukangehalt/Chitingehalt von stationäre-Phase-Zellen von Sabouraud-Agar-Platte
- ◆ / ◆ = Glukangehalt/Chitingehalt von stationäre-Phase-Zellen von YPD-Flüssigkultur
- ◆ / ◆ = Glukangehalt/Chitingehalt von logarithmische-Phase-Zellen von YPD-Flüssigkultur

### 3.1.2.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Zellwandzusammensetzung?

Vergleicht man die Ergebnisse aller im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung getesteten Substanzen mit dem im FACS quantifizierten Chitin- und Glukangehalt der ausgewählten Laborstämme, so besteht eine Korrelation zwischen der Höhe des Glukangehalts und der Empfindlichkeit gegenüber sämtlichen getesteten Substanzen (Abbildung 11 A-L). Bei abnehmenden Glukangehalt nimmt die Empfindlichkeit gegenüber Zellwanddestabilisierenden und antimykotisch wirksamen Substanzen ebenfalls ab.

Eine ähnliche Tendenz zeigte sich zwar auch für den Chitingehalt bei Zellen der stationären Phase direkt von Agar-Platte (Abbildung 11 A, D, G und J), allerdings erreichten die Unterschiede im Chitingehalt zwischen den Stämmen kein statistisch signifikantes Niveau. Bei Zellen der stationären (Abbildung 11 B,

E, H und K) und logarithmischen (Abbildung 11 C, F, I und L) Phase der Flüssigkultur zeigten sich dagegen keine Korrelationen zwischen Toleranzverhalten und dem Chitingehalt der Zellwand. Bei Zellen aus YPD-Flüssigkultur ließ sich lediglich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen erhöhtem Chitingehalt und erhöhter Toleranz gegenüber Blancophor P und Kongorot beobachten (Abbildung 11 B und E).

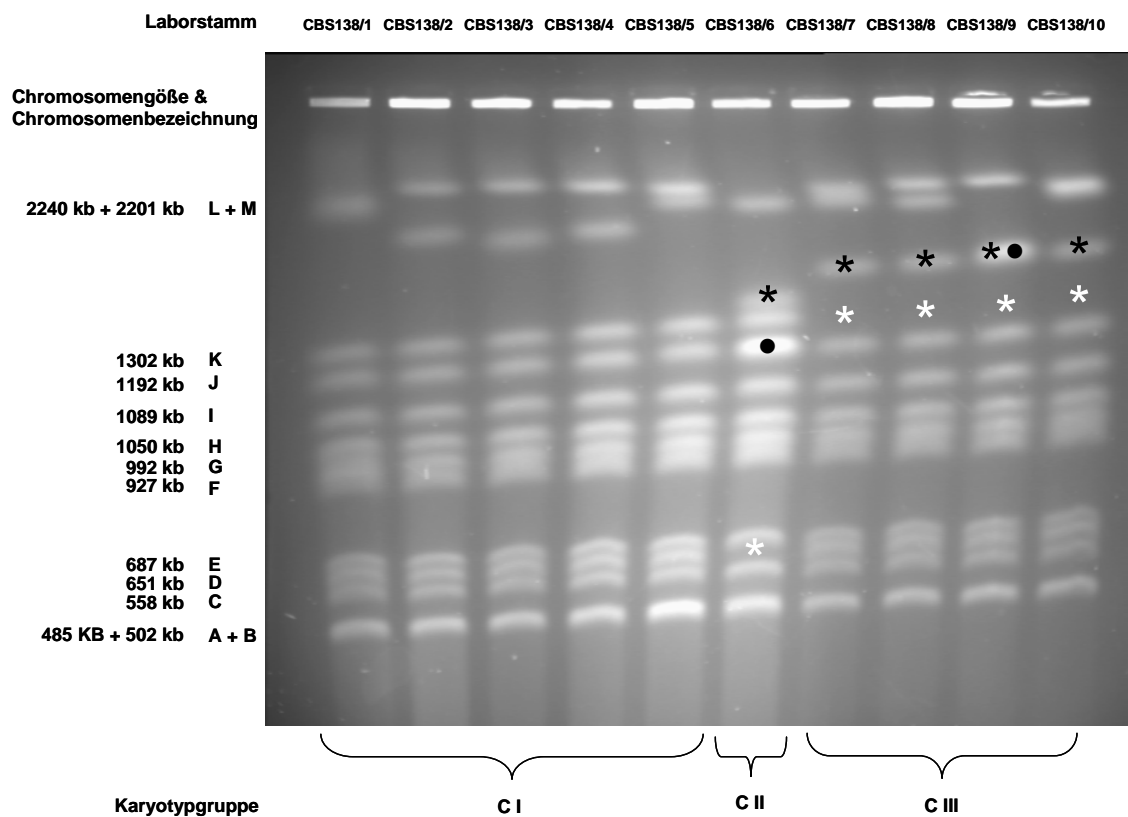


**Abbildung 11: Korrelation der Phänotypen ausgewählter Laborstämme mit dem jeweiligen Zellwandgehalt an Chitin und Glukan in unterschiedlichen Wachstumsphasen**  
 ◆◆ = Chitin/Glukangehalt CBS138/1, ▲/▲ = Chitin/Glukangehalt CBS138/6, ■/■ = Chitin/Glukangehalt CBS 138/7

### 3.1.3 Genotypische Charakterisierung der Laborstämme

#### Isogene Klone des Referenzstammes CBS138/1 zeigen Unterschiede im Karyotyp

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebenen phänotypischen Unterschiede der isogenen *C. glabrata*-Laborstämme auf karyotypische Veränderungen zurückzuführen sind, wurden diese Stämme mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) auf chromosomale Alterationen hin untersucht (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Pulsfeld-Gelelektrophorese isogener Laborstämme**

Die Zuordnung der Banden zu den entsprechenden Chromosomen A-M und Chromosomengrößen erfolgte wie in der Literatur beschrieben (DOI *et al.*, 1992; MULLER *et al.*, 2009; POLAKOVA *et al.*, 2009). Die Karyogramme der Stämme wurden zur Beurteilung auf chromosomale Aberrationen mit dem Bandenmuster des Referenzstammes CBS138/1 verglichen. Weißes Sternchen-Symbol = Verlust einer Bande, schwarzes Sternchen-Symbol = Erwerb einer zusätzlichen Bande, schwarzes Kreis-Symbol = Signalintensivierung einer Bande

Tatsächlich konnten die Karyotypen der zehn analysierten Stämme analog zu der phänotypischen Einteilung in drei Gruppen (C(I)-C(III)) unterteilt werden:

### **Gruppe C I**

Gruppe C(I) entsprach dem Karyotyp des Referenzstammes CBS138/1. Dieser Gruppe ließen sich des Weiteren die Stämme CBS138/2-5 zuordnen. Dies waren alle Stämme der Phänotypgruppe 1.

### **Gruppe C II**

Im Unterschied zu den Stämmen der Gruppe 1 wies der Stamm CBS138/6 (entsprechend der Karyotypgruppe C(II) und Phänotypgruppe 2) in der niedermolekularen Fraktion (485-700 kb) lediglich drei Chromosomen auf. In der mittleren Fraktion im Größenbereich zwischen 900 und 1300 kb unterschied er sich vom Karyotyp der Gruppe C(I) durch eine signalintensivere Bande, entsprechend Chromosom J, und durch eine zusätzliche Bande oberhalb von Chromosom K im Größenbereich von ca. 1400 kb

### **Gruppe C III**

Die Stämme der Karyotypgruppe C(III) besaßen ein zur Gruppe C(I) identisches Bandenmuster in der unteren und mittleren Fraktion, mit dem Unterschied des Verlusts der Chromosom K entsprechenden Bande und dem Auftauchen einer neuen, höhermolekularen Bande im Bereich zwischen den Chromosomen L und J mit einer Größe von ungefähr 1500 kb. Die zusätzliche Bande war beim Stamm CBS138/9, verglichen mit den anderen Stämmen dieser Gruppe, signalintensiver, so dass sich hier möglicherweise zwei ähnlich große Chromosomen befinden. Dieser Gruppe ließen sich die Stämme CBS138/7-10 zuordnen. Dies waren alle Stämme der Phänotypgruppe 3.

Des Weiteren konnte eine erhebliche Variabilität bei den beiden größten Banden entsprechend den Chromosomen L und M beobachtet werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, die zeigen konnten, dass diese Variabilität auf Längenpolymorphismen der auf diesen Chromosomen beherbergten rDNA-Loci und artifizielle *in vitro* Ereignisse zurückgeführt werden können (ASAKURA *et al.*, 1991, SHIN *et al.*, 2007). Bei der Beurteilung der Karyogramme wurden diese Banden daher nicht miteinbezogen.

Abschließend lässt sich sagen, dass in der Sequenztypisierung isogene Klone des Referenzstamms CBS138/1, die einen aberranten Karyotyp in der PFGE aufwiesen, über eine signifikant erhöhte Toleranz gegenüber Zellwanddestabilisierenden und antimykotischen Substanzen, sowie über einen veränderten Polymergehalt der Zellwand verfügten.

Die Beobachtung der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Zellwandzusammensetzung und Resistenz gegen verschiedene Substanzen bei Klonen des Labor-Referenzstamms CBS138/1 führte zu der Fragestellung, ob die nachgewiesenen karyotypischen Veränderungen in den Stämmen in ursächlichen Zusammenhang damit stehen und welche klinische Relevanz, z.B. für die antimykotische Therapie, diese Mechanismen haben.

## 3.2 Charakterisierung der klinischen Isolate

Um die klinische Relevanz und das Ausmaß der oben für die Laborstämme beschriebenen Phänomene näher zu untersuchen, wurde im Anschluss ein Kollektiv von 124 ausgewählten klinischen *C. glabrata*-Isolaten aus der EURESFUN-Sammlung (Bader, unpublizierte Daten) phänotypisch, zellwandbiochemisch und phylogenetisch charakterisiert. Die Isolate des Kollektivs stammten aus verschiedenen Kliniken Deutschlands, Spaniens, der Schweiz und der Tschechei. Um ein möglichst repräsentatives, heterogenes Kollektiv zu generieren, wurden Isolate von Patienten beider Geschlechter, aller Altersklassen und unterschiedlicher Primärerkrankungen ausgewählt. Neben Isolaten oberflächlicher Haut- und Schleimhautinfektionen stammte ein Großteil der Isolate aus primär sterilen Körperregionen und aus Blutkulturen.

Die phänotypische Analyse der Isolate erfolgte durch standardisierte Mikrodilutions-Testungen auf Zellwand-destabilisierende Substanzen und klinisch bedeutsame Antimykotika (3.2.1.1 & 2). Die somit gewonnenen Daten wurden daraufhin miteinander korreliert, um zu überprüfen, ob lineare Zusammenhänge im Toleranzverhalten gegenüber den getesteten Substanzen, bzw. zwischen Zellwandstabilität und Antimykotikaresistenz bestehen (3.2.1.3.1 & 2).

Mittels FACS wurde nachfolgend die Zellwandkomposition repräsentativer Isolate quantitativ analysiert (3.2.2.1 & 2) und mit den Ergebnissen aus den phänotypischen Tests verglichen (3.2.2.3). Somit sollte überprüft werden, ob die Ergebnisse der phänotypischen Tests bereits Rückschlüsse auf die Zellwandzusammensetzung erlauben.

Anschließend wurde die karyotypische Phylogenie mittels PFGE untersucht (3.2.3.1), um mögliche Zusammenhänge zwischen chromosomalen Aberrationen, Phänotyp und Zellwandzusammensetzung zu analysieren (3.2.3.1.2-5).

Abschließend wurde nach Bestimmung der molekularen Phylogenie mittels MLST der Fragestellung nachgegangen, ob Isolate isogener Kladen ähnliche phäno- und karyotypische Charakteristika, sowie Gemeinsamkeiten in der Zellwandzusammensetzung besitzen (3.2.3.2.1 & 2).



### 3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der klinischen Isolate

124 klinische Isolate wurden im Folgenden mittels Mikrodilutionstest (siehe 2.2.5 und 2.2.6) auf ihre Suszeptibilität gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot, sowie den klinisch relevanten Antimykotika Caspofungin und Fluconazol getestet.

Unter der Annahme einer Gauß'schen Normalverteilung im Toleranzverhalten der klinischen Isolate gegenüber den getesteten Substanzen wurde eine Einteilung anhand der mittleren minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Isolate in die drei Phänotyp-Kategorien hypersuszeptibel (-), intermediär (i) und hyposuszeptibel (+) vorgenommen. Dabei beinhalteten die Kategorien hyper- und hyposuszeptibel, wenn nicht anders angegeben, alle Isolate, deren mittlere MHK gegenüber der jeweils getesteten Substanz mehr als eine Standardabweichung unter, bzw. über der jeweiligen Halbwertsbreite lag. Die übrigen Isolate wurden jeweils in die Kategorie intermediär eingeordnet.

#### 3.2.1.1 Überprüfung der Zellwandstabilität

##### **Empfindlichkeit gegenüber den Zellwandstressoren Blancophor P und Kongorot**

Blancophor P und Kongorot sind Zellwand-destabilisierende Substanzen, die das Wachstum von Hefen über eine Bindung an die Polymere Chitin (Blancophor P) und  $\beta$ -1,3-Glukan (Kongorot) inhibieren und somit indirekt Rückschlüsse auf deren Zellwandzusammensetzung erlauben.

Bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Blancophor P waren die klinischen Isolate weitestgehend normalverteilt. Als einzige Ausnahme entfielen auf die intermediäre Titerstufe 1,5 mg/ml mehr Isolate, als im Sinne einer Normalverteilung zu erwarten gewesen wäre.

Insgesamt lagen 15% der Isolate im hypersuszeptiblen Bereich (entsprechend den Titerstufen 0,09 mg/ml - 0,19 mg/ml), 72% der Isolate im intermediären (entsprechend den Titerstufen 0,25 mg/ml - 1,5 mg/ml) und 13% der Isolate im

hyposuszeptiblen Bereich (entsprechend den Titerstufen 2 mg/ml - 6 mg/ml) (Abbildung 13 A).

Die Kongorot Testung zeigte mit 14% der Isolate im hypersuszeptiblen Bereich (entsprechend den Titerstufen 0,2 µg/ml - 0,78 µg/ml), ebenfalls 72% der Isolate im intermediären (entsprechend den Titerstufen 1,56 µg/ml - 12,5 µg/ml) und 14% der Isolate im hyposuszeptiblen Bereich (entsprechend den Titerstufen 25 µg/ml - 200 µg/ml) eine ähnliche normalverteilte Aufteilung (Abbildung 13 B).

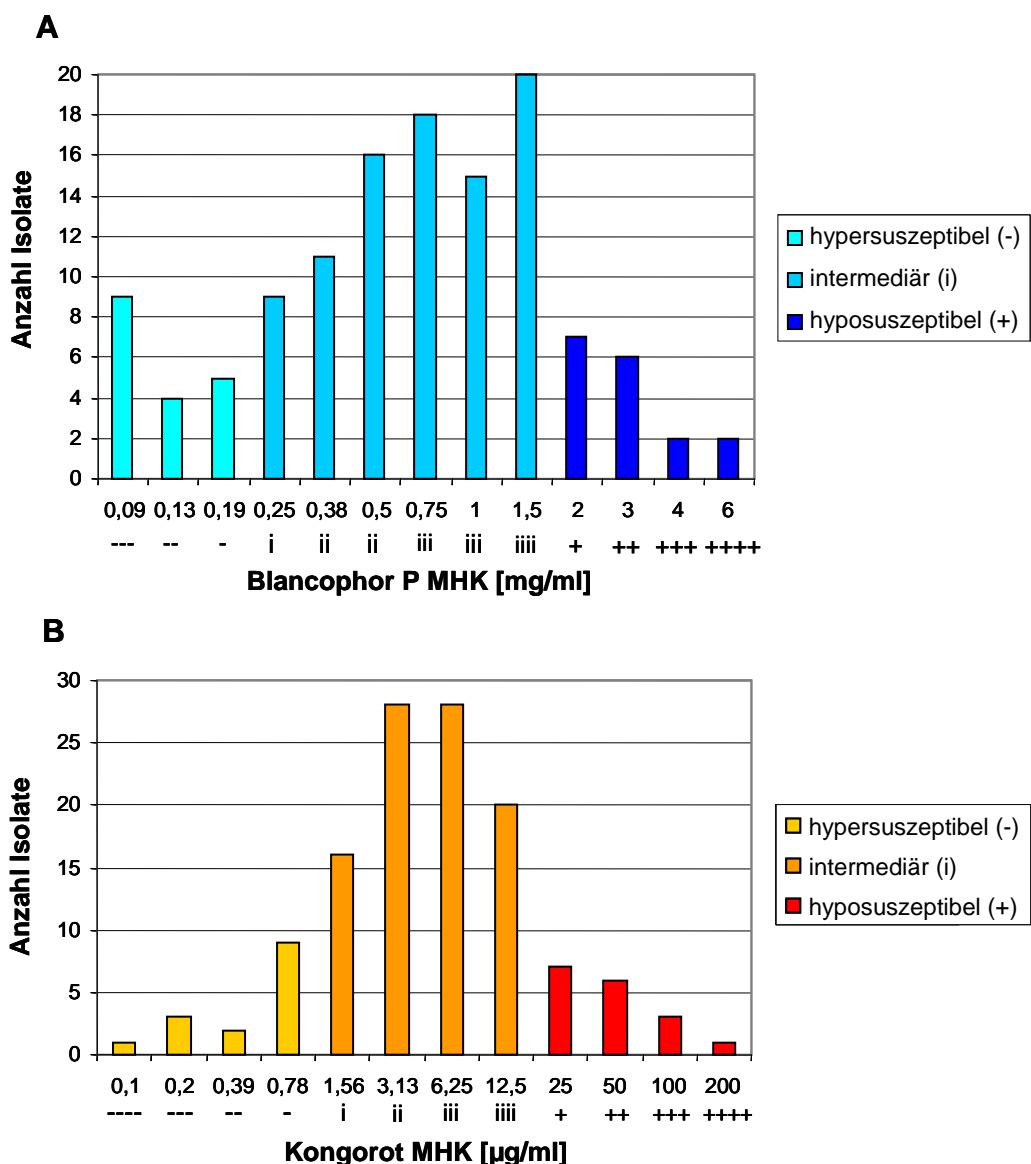


Abbildung 13: Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber den Zellwanddestabilisierenden Substanzen Blancophor P (A) und Kongorot (B)

### 3.2.1.2 Resistenzbestimmung

#### Empfindlichkeit gegenüber den klinisch bedeutenden Antimykotika Caspofungin und Fluconazol

Caspofungin ist ein Zellwand-wirksames Antimykotikum, dass über die Inhibition der  $\beta$ -1,3-Glukan Synthase wirkt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Korrelation von Caspofungin-Toleranz und Zellwandstabilität, bzw. mit der Zellwandzusammensetzung der klinischen Isolate untersucht werden.

Zunächst fiel auf, dass die Isolate in der Caspofungin-Resistenzbestimmung maximal bis zur siebten Titerstufe der verwendeten Verdünnungsreihe wuchsen. Dabei ließ sich eine Normalverteilung der Caspofungin-Toleranz der Isolate auf die im Bereich dieser Kategorie liegenden Titerstufen beobachten. Insgesamt entfielen 3% der getesteten Isolate in die Kategorie hypersuszeptibel (entsprechend der Titerstufe 0,016  $\mu\text{g/ml}$ ), 84% der getesteten Isolate in die Kategorie intermediär (entsprechend den Titerstufen 0,032 - 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ) und 13% in die Kategorie hyposuszeptibel (entsprechend den Titerstufen 0,25 - 2  $\mu\text{g/ml}$ ) (Abbildung 14).

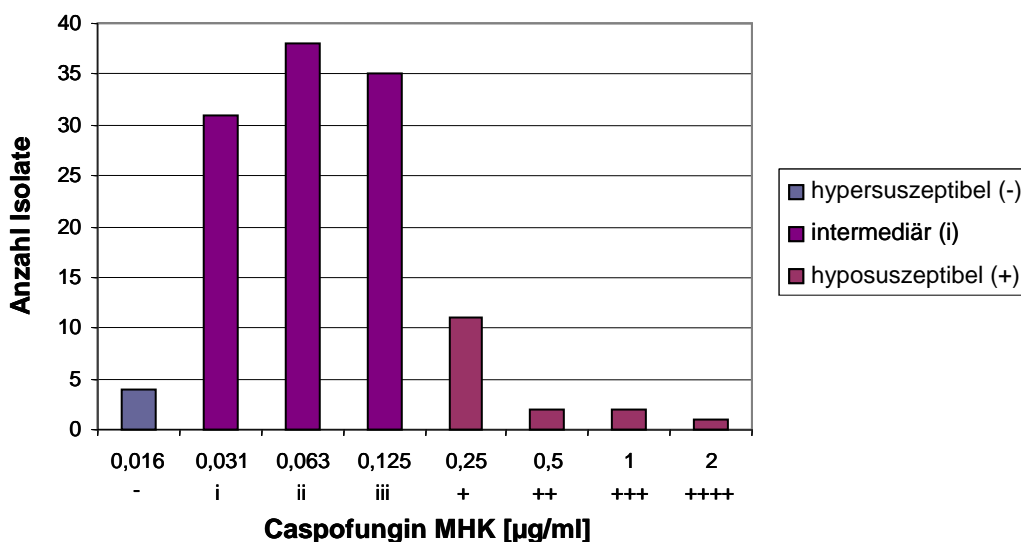


Abbildung 14: Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber dem Zellwand-wirksamen Antimykotikum Caspofungin

Das Antimykotikum Fluconazol wird regelhaft in der Klinik zur Prophylaxe und in der Behandlung von oberflächlichen und systemischen Candidosen eingesetzt. Es entfaltet seine wachstumshemmende Wirkung über die Inhibition der Synthese des essentiellen Plasmamembran-Bausteins Ergosterol.

Die hier untersuchte Zusammenstellung klinischer Isolate zeigte im Gegensatz zu den restlichen im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung verwendeten Substanzen keine Normalverteilung bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Fluconazol. Dies liegt unter anderem in der Tatsache begründet, dass *C. glabrata* als wesentlichen Virulenzfaktor von Natur aus über eine intrinsische Hyposuszeptibilität gegenüber Azol-Antimykotika verfügt. Dies bedingte eine Rechtsverschiebung der Toleranzverteilung verglichen mit Azol-suszeptiblen Hefen, wie z.B. *C. albicans*. Darüberhinaus konnten zwei zusätzliche Kurvengipfel im grenzwertig hyposuszeptiblen (iiii) und hyposuszeptiblen Bereich (+++) beobachtet werden (Abbildung 15). Diese Beobachtung steht in Kongruenz mit den Ergebnissen groß angelegter Resistenzbestimmungen klinischer *Candida*-Isolate (HOF, 2003; siehe auch 1.5).

Bei der hier durchgeführten Testung auf Fluconazol lagen somit lediglich 6% im hypersuszeptiblen Bereich (entsprechend den Titerstufen 0,13 - 1 µg/ml), 61% der Isolate im intermediären Bereich (entsprechend den Titerstufen 2 - 16 µg/ml) und 33% der Isolate im hyposuszeptiblen Bereich (entsprechend den Titerstufen 32 - 256 µg/ml).

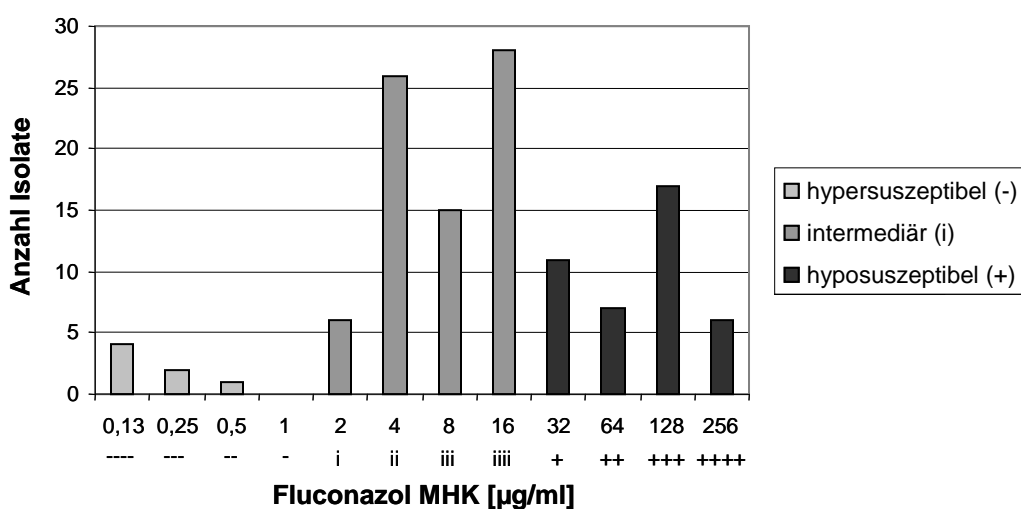


Abbildung 15: Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol

### 3.2.1.3 Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Phänotypen

Mittels Regressionsanalyse wurde im Folgenden untersucht, ob die unterschiedlichen Phänotypen gegenüber den unter 3.2.1.1 und 3.2.1.2 getesteten Substanzen in einem linearen Abhängigkeitsverhältnis zueinander stehen.

#### 3.2.1.3.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität gegenüber Blancophor P und Kongorot?

Die Empfindlichkeit eines Stammes gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot erlaubt indirekt Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Zellwand und deren Stabilität. Es ist jedoch nicht bekannt, ob der vermeintliche Gehalt beider Polymere in einem bestimmten Abhängigkeitsverhältnis zueinander steht.

Die Auswertung der Regressionsanalyse ergab einen linearen Zusammenhang im Toleranzverhalten gegenüber Blancophor P und Kongorot und bestätigte somit diese bereits bei der phänotypischen Charakterisierung des isogenen Laborstamm-Kollektivs gemachte Beobachtung (Abbildung 16). Dies könnte bedeuten, dass Stämme, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Blancophor P und Kongorot zeigen, einen hohen Chitin- und Glukangehalt besitzen und somit über eine hohe Stabilität der Zellwand verfügen und *vice versa*.

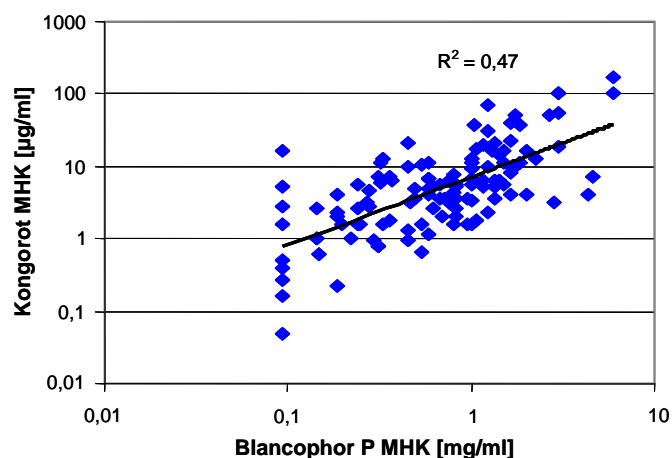
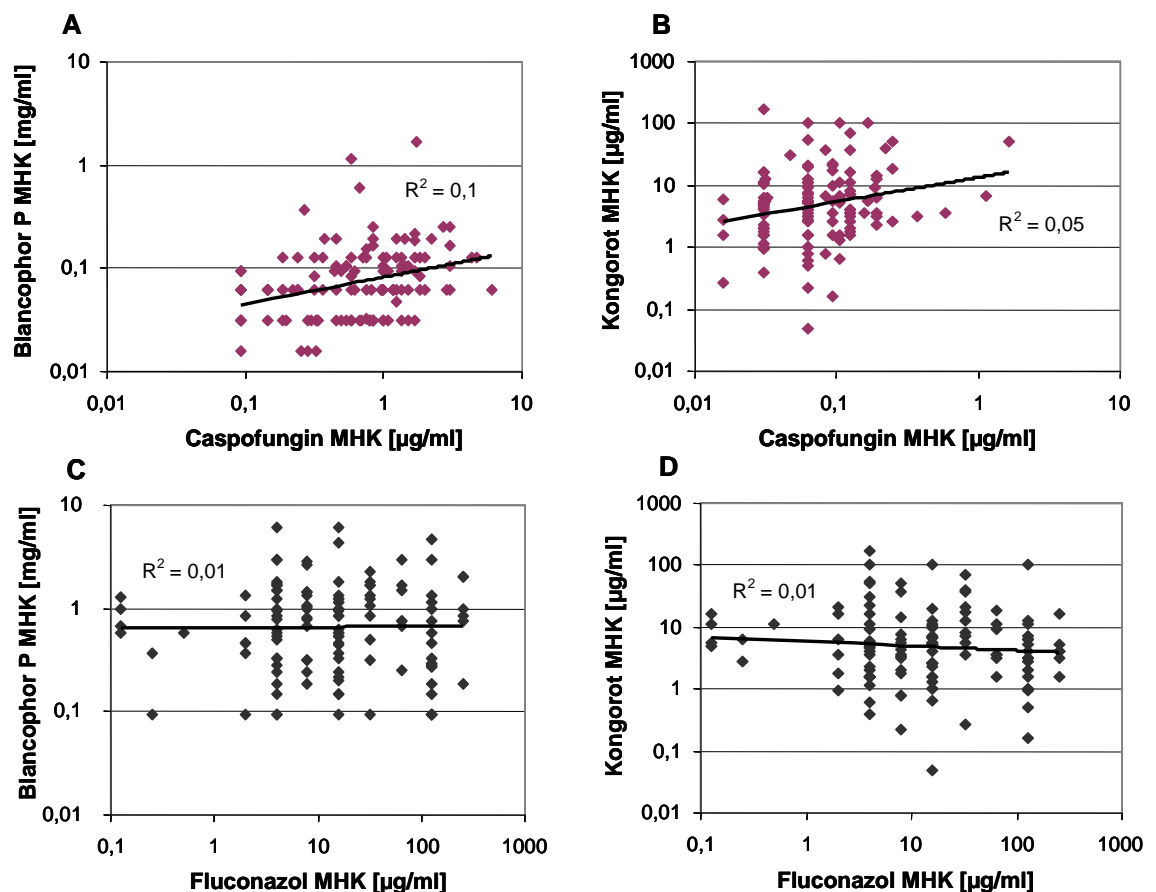


Abbildung 16: Vergleich der Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber Blancophor P mit der Empfindlichkeit gegenüber Kongorot

### 3.2.1.3.2 Besteht ein Zusammenhang zwischen Zellwandstabilität und Resistenz?

Da die Beschaffenheit der Zellwand direkten oder indirekten Einfluss auf die Aufnahme von antimykotischen Substanzen in die Hefezelle und deren antifungale Wirkung haben könnte, wurden die Empfindlichkeiten der Isolate gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot mit der Toleranz gegenüber den klinisch relevanten Antimykotika Caspofungin und Fluconazol auf Korrelationen hin untersucht (Abbildung 17 A-D).

Darüber hinaus wurde noch eine mögliche Korrelation zwischen Caspofungin- und Fluconazol-Suszeptibilität überprüft, um eventuell bestehende Zusammenhänge und Kreuzresistenzen aufzudecken (Abbildung 17 E). Das ermittelte Bestimmtheitsmaß ergab jedoch für keines der analysierten Phänotypenpaare eine lineare Abhängigkeit.



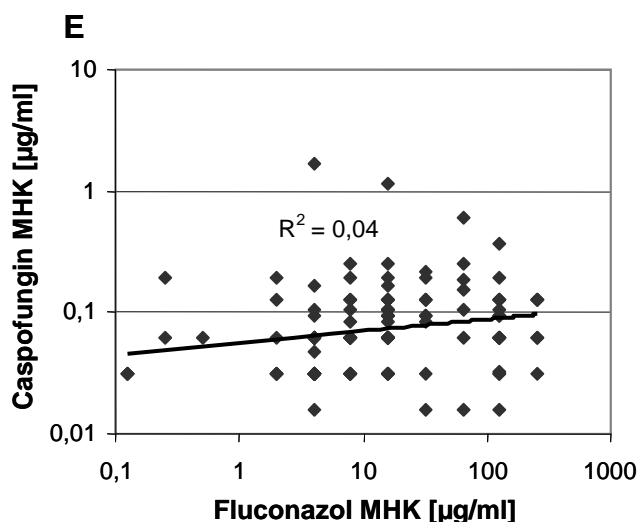


Abbildung 17: Überprüfung möglicher Korrelationen der Phänotypen gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot und den klinisch bedeutsamen Antimykotika Caspofungin und Fluconazol aller klinischen Isolate

### 3.2.2 Quantitative Analyse der Zellwandzusammensetzung ausgewählter klinischer Isolate mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Um die auf den Ergebnissen der phänotypischen Charakterisierung basierenden Hypothesen zu überprüfen, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die unterschiedliche Suszeptibilität der klinischen Isolate gegenüber den Zellwand-destabilisierenden und antimykotischen Substanzen Rückschlüsse auf die quantitative Zusammensetzung der Zellwand und mögliche phänotypische Korrelationen mit dieser erlaubt.

Zu diesem Zweck wurden 30 bezüglich ihrer Toleranz gegenüber allen getesteten Substanzen repräsentative klinische Isolate ausgewählt und der Gehalt der Zellwandpolymere Chitin und Glukan durch spezifische Färbung und Quantifizierung im FACS bestimmt.

Die Messungen wurden auf Zellwände stationärer Phase Zellen aus YPD-Flüssigkultur beschränkt, da diese bei der Analyse der Laborstämme die signifikantesten Messwerte ergeben hatten (siehe Abschnitt 3.1.2).

Analog zu den phänotypischen Kategorisierungen (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde auch hier eine Einteilung bezüglich der Höhe des jeweiligen Polymergehalts der Isolate in drei Kategorien vorgenommen (niedriger Polymergehalt (-), mittlerer Polymergehalt (i) und hoher Polymergehalt (+)).

### **3.2.2.1 Quantitative Analyse des Chitingehalts**

Um den Chitingehalt der Zellwände von stationäre-Phase-Zellen aus YPD-Flüssigkultur im FACS zu quantifizieren, wurden die klinischen Isolate mit AlexaFluor®-488-konjugiertem Weizenkeim-Agglutinin angefärbt.

Bei der Auswertung der quantitativen Chitin-Analyse der klinischen Isolate zeigte sich eine Normalverteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Spektrum von 10 bis 45 FE, entsprechend dem jeweiligen Chitingehalt der Zellen. 14% der Isolate besaßen einen niedrigen Chitingehalt (< 12,5 FE), 69% der Isolate einen mittleren Chitingehalt (12,5 - 27,4 FE) und 17% der Isolate zeigten einen hohen Chitingehalt (> 27,5 FE) (Abbildung 19 A).

### **3.2.2.2 Quantitative Analyse des Glukangehalts**

Die Zellwände derselben klinischen Isolate wie unter 3.2.3.1 wurden daraufhin mit Kongorot angefärbt und der Glukangehalt der Zellwände von stationäre-Phase-Zellen mittels FACS quantifiziert.

Analog zur Verteilung des Chitingehalts zeigte sich bei der Auswertung der quantitativen Analyse des Glukangehalts der Zellwände der 30 klinischen Isolate ebenfalls eine Normalverteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Spektrum von 200 bis 600 FE, entsprechend dem jeweiligen Glukangehalt der Zellen. 6% der getesteten Isolate wiesen hierbei einen niedrigen Glukangehalt (< 225 FE) auf, 70% besaßen einen mittleren Glukangehalt (225 - 374 FE) und 24% der Isolate zeigten einen hohen Glukangehalt (>375 FE) (Abbildung 19 B).



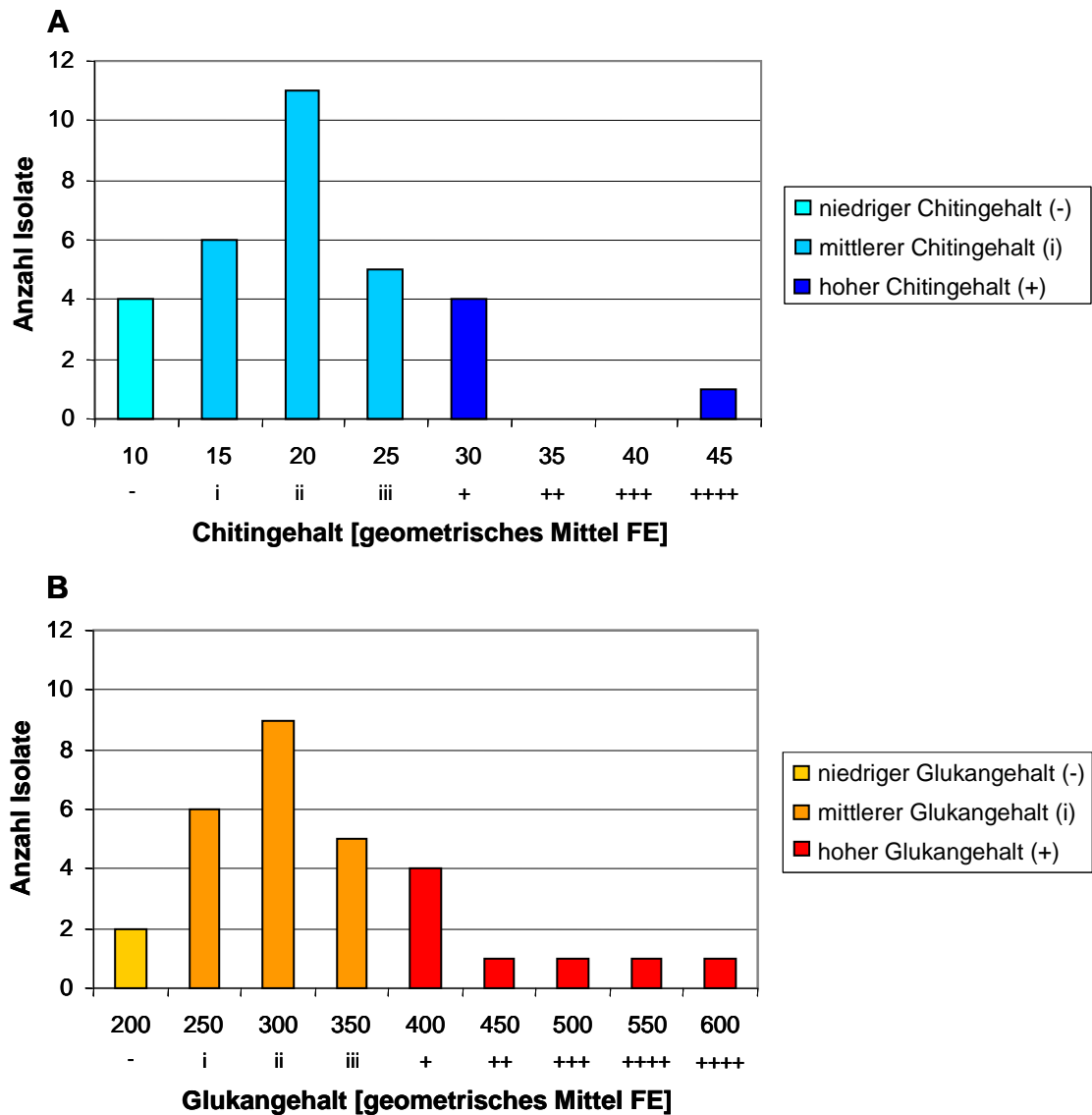


Abbildung 19: Verteilung des im FACS quantifizierten mittleren Chitin- und Glukangehalts der Zellwände von 30 repräsentativen klinischen Isolaten in der stationären Phase von YPD-Flüssigkultur

### 3.2.2.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Zellwandzusammensetzung?

Zur Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen den beobachteten Phänotypen und der Zellwandzusammensetzung besteht, wurde zunächst untersucht, ob der Chitin- und Glukangehalt in einem ähnlichen Abhängigkeitsverhältnis steht, wie die Messwerte aus den phänotypischen Tests mit den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot.

Des Weiteren wurde die jeweilige Suszeptibilität der repräsentativen Isolate gegenüber allen im Mikrodilutionstest getesteten Substanzen mit dem jeweiligen Polymergehalt verglichen. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß ergab jedoch weder einen linearen Zusammenhang für den Chitin- und Glukangehalt der Isolate (Abbildung 20), noch für Polymergehalt und Phänotyp (Abbildung 21). Es zeigte sich lediglich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen Glukangehalt und der Suszeptibilität gegenüber Fluconazol. (Abbildung 21 D).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die unterschiedlichen MHKs, bzw. Phänotypen nicht, oder nur bedingt durch den Gehalt an Chitin oder Glukan in der Zellwand zu erklären sind

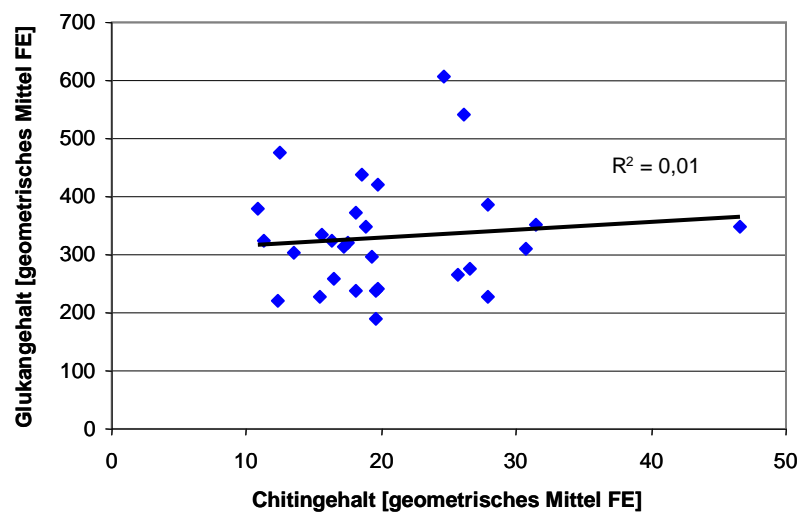


Abbildung 20: Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs von Chitin- und Glukangehalt aller im FACS quantifizierten klinischen Isolate

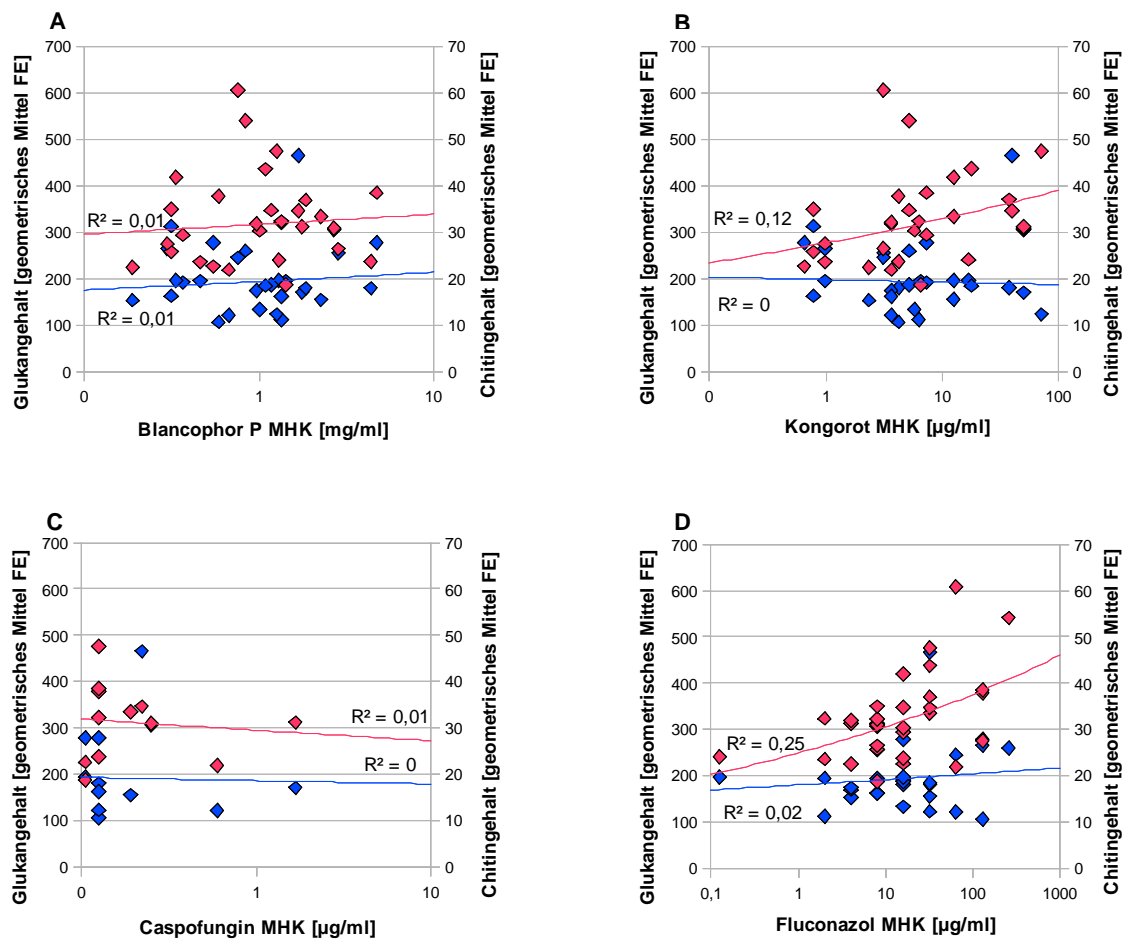


Abbildung 21: Überprüfung auf mögliche Korrelationen der unterschiedlichen Phänotypen mit dem Chitin (♦)- und Glukangehalt (♦) von Zellwänden von stationäre-Phase-Zellen einer YPD-Flüssigkultur aller im FACS analysierten klinischen Isolate

### 3.2.3 Phylogenetische Charakterisierung der klinischen Isolate

Im ersten Schritt der phylogenetischen Charakterisierung wurde mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) die karyotypische Phylogenie der klinischen Isolate durch Vergleich von Chromosomenzahl und -größe analysiert. Daraufhin sollte überprüft werden, ob spezifische karyotypische Veränderungen mit bestimmten Phänotypen und/oder Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung assoziiert sind.

In einem zweiten Schritt wurde der evolutionäre Verwandtschaftsgrad der klinischen Isolate auf Ebene von Nukleotidsequenzen mittels Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) bestimmt.

Durch Vergleich der molekularen mit der karyotypischen Phylogenie wurde anschließend analysiert, ob sich in isogenen MLST-Kladen gehäuft Isolate gleichen Karyotyps finden, oder ob sich eine ähnliche oder sogar größere karyotypische Variabilität zeigt, wie es bei dem zuvor untersuchten Laborstamm-Kollektiv beobachtet werden konnte.

Abschließend wurde die Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen auf die MLST-Kladen im Vergleich mit der prozentualen Verteilung im Gesamtkollektiv beurteilt.

#### 3.2.3.1 Elektrophoretische Karyotypisierung

##### 3.2.3.1.1 Klinische Isolate zeigen Unterschiede im Karyotyp

Die klinischen Isolate wurden zunächst mittels PFGE auf Unterschiede im Karyotyp hin untersucht:

Eine erste Einteilung ließ sich aufgrund der Eigenschaft vornehmen, ob das jeweilige Isolat das Chromosom I besaß (Gruppe A, 57 Isolate, Abbildung 22 A) oder nicht (Gruppe B, 67 Isolate, Abbildung 22 B und C).

Der Stamm CBS138/1 wurde bei den PFGE-Analysen als Referenz zur Beurteilung der mittleren Bandenfraktion (Chromosomen F-K) mitgeführt. Er

ließ sich der Gruppe A zuordnen. Allerdings stellte er sich beim Vergleich der unteren Banden der Karyogramme (Chromosomen A-E) als nicht repräsentativ heraus, da keines der getesteten Isolate über ein ähnliches Muster in diesem Bereich verfügte.

Als zweite Referenz wurde daher zur Beurteilung der niedermolekularen Fraktion innerhalb der beiden Hauptgruppen A und B jeweils derjenige Karyotyp herangezogen, dem sich die meisten der Isolate zuordnen ließen (hier als A(I) und B(I) bezeichnet). Insgesamt ließen sich diesen gruppeninternen Referenzen jeweils 40 (A(I)) und 41 (B(I)) der klinischen Isolate zuordnen. Diese beiden Karyotypen repräsentierten somit die beiden größten klonalen Gruppen innerhalb des hier untersuchten Kollektivs.

Zusätzlich fanden sich weitere 30 Karyotypen (als A(II)-A(XIV) und B(II)-B(XVIII) bezeichnet), die sich sowohl untereinander, als auch vom Bandenmuster der jeweiligen gruppeninternen Referenz unterschieden.

Neben dem Verlust von Banden konnten auch das Auftauchen neuer Banden, die Signalintensivierung einiger Banden, sowie diskrete Größenveränderungen der Banden beobachtet werden.

Mit Ausnahme der Karyotypen A(V) und A(X) (jeweils zwei Isolate), B(II) (drei Isolate), B(VI) (sechs Isolate) und B(X) (vier Isolate) fanden sich die übrigen Karyotypen lediglich einmal innerhalb des elektrophoretisch karyotypisierten Kollektivs.

Bei der Beurteilung der Bandenmuster wurden aufgrund der bereits unter 3.1.3 beschriebenen Variabilität von Chromosomen der hochmolekularen Fraktion gezielt nur die Chromosomen der niedermolekularen und mittleren Fraktion bis zu einer Größe von ca. 1600 kb miteinbezogen,

Alle Pulsfeld-Gele, von denen die nachfolgend für die Abbildungen verwendeten Karyogramme stammen und/oder die zur Beurteilung der Isolate auf karyotypische Alterationen dienten, sind im Original im Anhang aufgeführt (siehe 6.3).

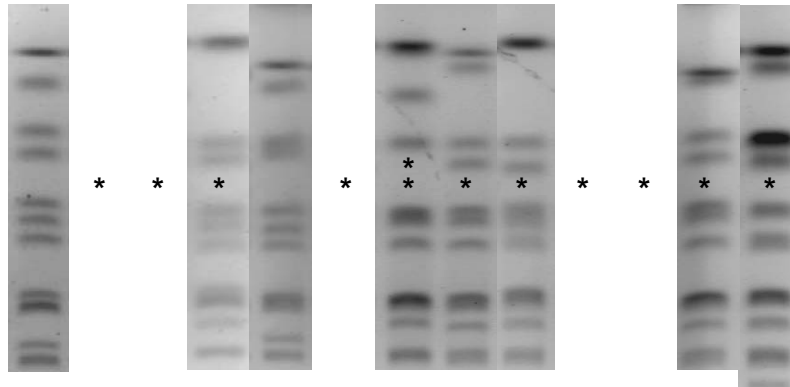
**A**

Isolat CBS138/1 EU0103 EU0050 EU1010 EU0090 EU0029 EU0045 EU0044 EU0060 EU0276 EU0099 EU0105 EU0162 EU0063 EU0357 EU0064 EU0054  
 Chromosomengröße & Chromosomenbezeichnung

Karyotyp A- I II III IV V VI VII VIII IX X XI XII XIII XIV

**B**

Isolat CBS138/1 EU0057 EU1013 EU0037 EU0039 EU0348 EU0102 EU0092 EU0063 EU0277 EU0227 EU0359 EU0152 EU0283  
 Chromosomengröße & Chromosomenbezeichnung



Karyotyp B- I II III IV V VI VII

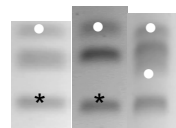
**C**

Isolat CBS138/1 EU0386 EU0089 EU0027 EU0387 EU0028 EU0181 EU0100 EU0033 EU0213 EU0228 EU0053 EU0046 EU0284 EU0233  
 Chromosomengröße & Chromosomenbezeichnung

2240 kb + 2201 kb L+M

1302 kb K  
 1192 kb J  
 1089 kb I

687 kb E  
 651 kb D  
 558 kb C  
 485 kb + 502 kb A+B



Karyotyp B- VIII IX X XI XII XIII XIV XV XVI XVII XVIII

**Abbildung 22: 124 klinische Isolate der Spezies *C. glabrata* zeigten in der PFGE 32 unterschiedliche Karyotypen**

(A) Karyotypen von Isolaten, die das Chromosom I besaßen. (B) und (C) Karyotypen von Isolaten, die das Chromosom I nicht besaßen. Die Karyotypen des Laborstamms CBS138/1, sowie der beiden größten ermittelten karyotypisch klonalen Gruppen A(I) und B(I), dienen als Referenz bei der makroskopischen Beurteilung der Karyogramme der übrigen Isolate auf strukturelle und numerische chromosomale Aberrationen.

Schwarzes Sternchen-Symbol = Verlust einer Bande, weißes Sternchen-Symbol = zusätzliche Bande, weißes Quadrat-Symbol = Signalintensivierung einer Bande/mutmaßliche Doppelbande, weißes Kreis-Symbol = mutmaßlicher Banden-Shift/diskrete Größenveränderung

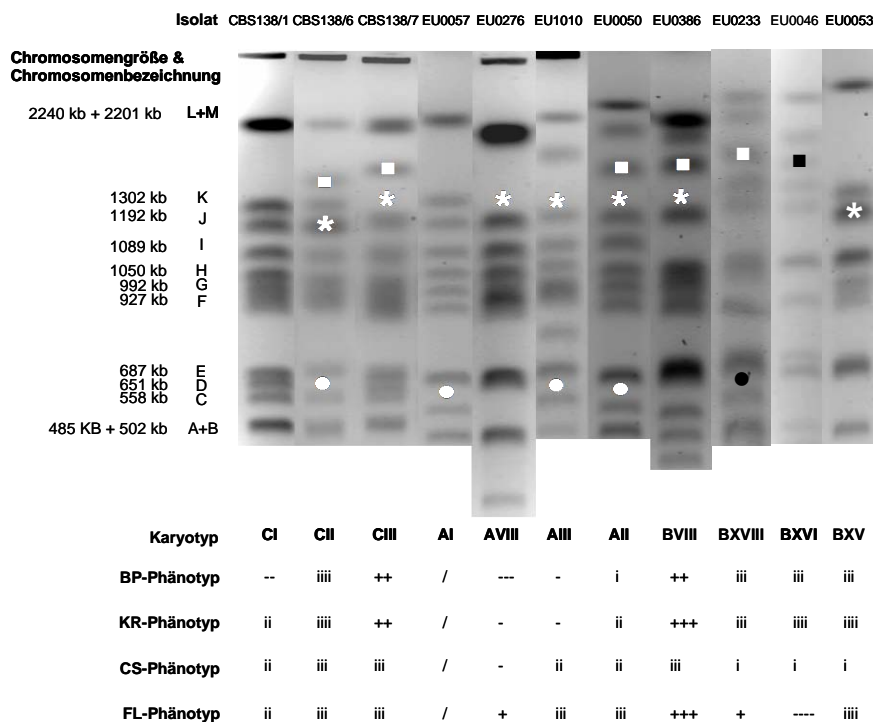
### **3.2.3.1.2 Zeigen klinische Isolate mit chromosomalen Aberrationen der Laborstamm-Karyotypgruppen C(II) und C(III) ähnliche Phänotypen?**

Die bei den isogenen Laborstämmen ermittelten Karyotypen ließen sich bei keinem der typisierten klinischen Isolate in exakt der gleichen Form wieder finden. Allerdings verfügten vier Isolate (EU0050, EU276, EU0386, EU1010) über den, für die Karyotypgruppe C(III) charakteristischen Verlust der dem Chromosom K entsprechenden Bande (Abbildung 23). Bei drei Isolaten (EU0050, EU233, EU0386) fand sich die für diese Gruppe charakteristische, zusätzliche neu entstandene Bande im hochmolekularen Bereich zwischen den dem Chromosom J und Chromosom L entsprechenden Banden von ungefähr 1600 kb.

Alle Isolate des Referenz Karyotyps A(I), sowie die Isolate EU0050, EU0233 und EU1010 verfügten hingegen in der niedermolekularen Fraktion über ein zur Karyotypgruppe C(II) identisches Bandenmuster. Die ebenfalls für diese Karyotypgruppe charakteristische Signalintensivierung der dem Chromosom J entsprechenden Bande fand sich darüber hinaus bei dem Isolat EU0053.

Ein ähnlicher Zusammenhang phänotypischer Charakteristika mit diesen karyotypischen Veränderungen, wie er bei den Laborstämmen beobachtet werden konnte, bestand jedoch nicht.

Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass alle der oben aufgeführten Isolate zusätzliche, individuelle karyotypische Veränderungen zeigten, die sie sowohl untereinander, als auch von den Karyotypen der Laborstämme unterschieden.



**Abbildung 23: Klinische Isolate mit chromosomalen Aberrationen der Laborstamm-Karyotypgruppen C(II) und C(III) und ihre Phänotypen**

Ähnliche Aberrationen, verglichen mit dem Karyogramm des Referenzstamms CBS138/1, wurden jeweils mit einem gleichen Symbol markiert. Das Karyogramm des Isolats EU0057 wurde als repräsentatives Karyogramm der insgesamt 40 Isolate umfassenden Karyotypgruppe A(I) ausgewählt. BP = Blancophor P, KR = Kongorot, CS = Caspofungin, FL = Fluconazol. (-) - (---) = hypersuszeptibler Phänotyp, (i) - (iiii) = intermediärer Phänotyp, (+) - (++++) = hyposuszeptibler Phänotyp

### 3.2.3.1.3 Sind bestimmte karyotypische Veränderungen mit charakteristischen Phänotypen assoziiert?

Um herauszufinden, ob bestimmte karyotypische Veränderungen mit einem bestimmten Phänotypen gegenüber den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen einhergehen, wie es bei der Analyse der Laborstämme beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.1), wurde nachfolgend die Verteilung von Isolaten mit aberrantem Karyotyp unter allen Isolaten mit einer MHK im hyper- oder hyposuszeptiblen Bereich ermittelt und mit der Verteilung im Gesamtkollektiv verglichen.

Die auf die jeweiligen Suszeptibilitätskategorien entfallenden Isolate wiesen zu jeweils einem Drittel den Referenzkaryotyp A(I), den Referenzkaryotyp B(I) und verglichen mit diesen aberrante Karyotypen auf. Unter den Isolaten mit



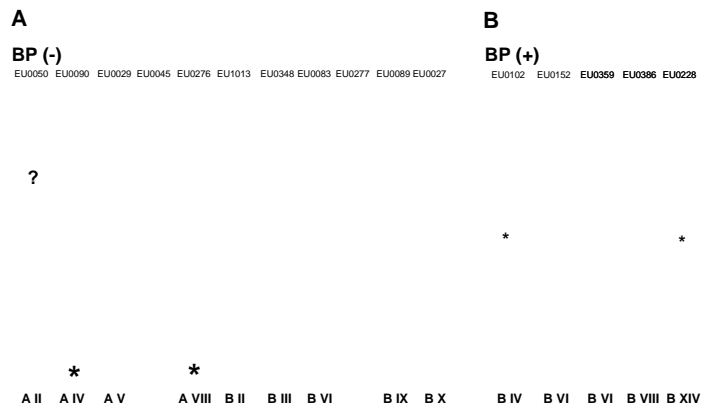
aberrantem Karyotyp fanden sich überwiegend Karyogramme der B-Gruppe. Dies entsprach der prozentualen Verteilung im Gesamt Kollektiv (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Karyotypen aller Isolate mit hyper (-)- oder hyposuszeptiblem (+) Phänotyp**

	n Isolate	KT A(I)	KT B(I)	KT aberrant	KT A aberrant	KT B aberrant
<b>Gesamt Kollektiv</b>	124	32%	33%	35%	12%	23%
<b>BP (-)</b>	18	33%	33%	33%	11%	22%
<b>BP (+)</b>	17	35%	30%	35%	6%	29%
<b>KR (-)</b>	17	35%	30%	35%	17,5%	17,5%
<b>KR (+)</b>	16	25%	31%	44%	7%	38%
<b>CS (-)</b>	4	25%	25%	50%	25%	25%
<b>CS (+)</b>	15	27%	40%	33%	13%	20%
<b>FL (-)</b>	7	29%	14%	57%	-	57%
<b>FL (+)</b>	40	30%	30%	40%	10%	30%

KT A(I) = Anteil der Isolate mit dem Referenzkaryotyp A(I), KT B(I) = Anteil der Isolate mit dem Referenzkaryotyp B(I), KT aberrant = Gesamtheit aller Isolate mit aberrantem Karyotyp, KT A aberrant = Anteil von Isolaten mit aberrantem A-Karyotyp an der Gesamtheit aller Isolate, KT B aberrant = Anteil von Isolaten mit aberrantem B-Karyotyp an der Gesamtheit aller Isolate. BP = Blancophor P, KR = Kongorot, CS = Caspofungin, FL = Fluconazol. (-) = hypersuszeptibler Phänotyp, (+) = hyposuszeptibler Phänotyp

Karyotypische Alterationen, die bei mehreren Isolaten gleichen Phänotyps gefunden wurden und denen eine mögliche ätiologische Bedeutung bezüglich des jeweiligen Phänotyps zukommen könnte, sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei karyotypisch aberranten Isolaten nahezu aller Phänotypen fanden sich Gemeinsamkeiten in der niedermolekularen Fraktion der Karyogramme im Bereich der Chromosomen C - E. Bei den hyposuszeptiblen Phänotypen waren in der mittleren Bandenfraktion im Bereich zwischen den beiden Chromosomen G und H gehäuft karyotypische Veränderungen (Signalintensivierung und mögliche Größenveränderungen von Banden) zu beobachten (Abbildung 24 B, D, F und G). Bei den Fluconazol-Phänotypen fand sich eine verstärkte Dominanz der aberranten B-Karyotypen. Unter diesen fand sich wiederum vermehrt der Karyotyp B(VI).



**Abbildung 24: Karyogramme von Isolaten mit aberrantem Karyotyp und einem hyper (-) - oder hyposuszeptiblen (+) Phänotyp gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P (BP) und Kongorot (KR) (A-D), sowie den Antimykotika Caspofungin (CS) und Fluconazol (FL) (E-H)**

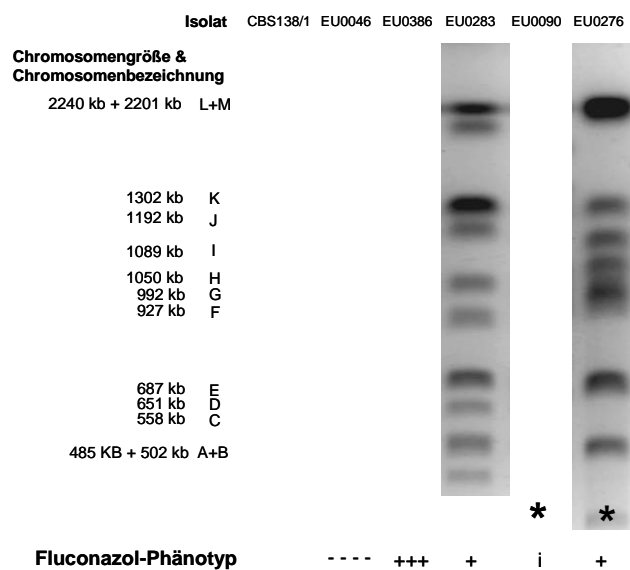
Die drei Referenzkaryotypen C(I), A(I) und B(I) dienen zur Beurteilung der Isolate auf Veränderungen im Bandenmuster in der PFGE. Innerhalb einer Phänotypengruppe wurden Aberrationen mit einem gleichen Symbol markiert, wenn sie bei mehr als einem Isolat ungleichen Karyotyps gefunden werden konnten.

### 3.2.3.1.4 Klinische Isolate mit einem Minichromosom

In der Literatur ist beschrieben, dass *C. glabrata*-Isolate, die ein „Minichromosom“ im niedermolekularen Bereich aufweisen, eine höhere Toleranz gegenüber Azolen zeigen können (POLAKOVA *et al.*, 2009).

Fünf der getesteten Isolate verfügten über eine solche zusätzliche Bande im niedermolekularen Bereich unterhalb der kleinsten Chromosomen A und B (< 485 kb). Von diesen Isolaten wiesen drei Isolate einen hyposuszeptiblen Phänotyp gegenüber Fluconazol auf, so dass hier über die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen dem Erwerb eines Minichromosoms und erhöhter Azol-Toleranz spekuliert werden kann.

Allerdings zeigten weitere zwei Isolate mit Minichromosom einen intermediären, bzw. hypersuszeptiblen Phänotyp gegenüber Fluconazol (Abbildung 25).



#### Abbildung 25: Isolate mit einem „Minichromosom“ (\*) im niedermolekularen Bereich

Zur Beurteilung der Chromosomengröße wurde das Karyogramm des Referenzstamms CBS138/1 verwendet. (-) - (----) = hyposuszeptibler Phänotyp, (i) - (iii) = intermediärer Phänotyp, (+) - (+++++) = hypersuszeptibler Phänotyp

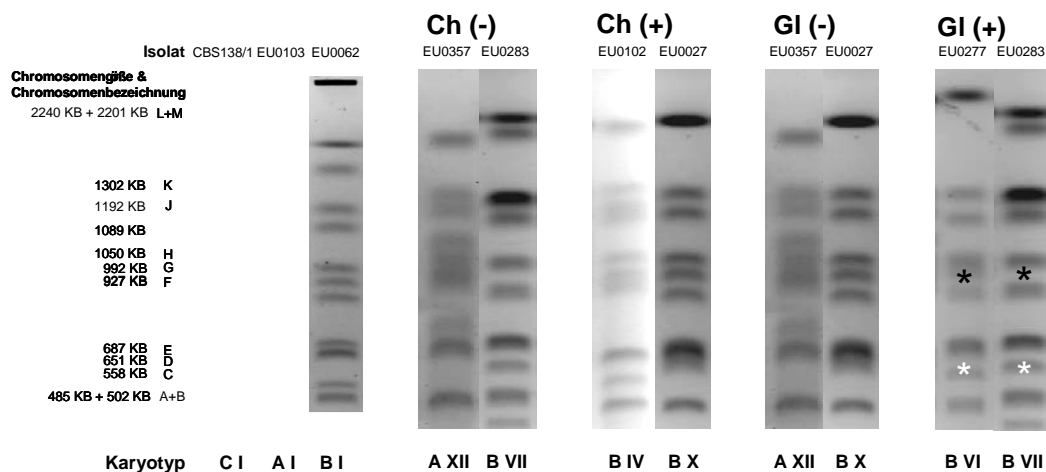
### 3.2.3.1.5 Sind bestimmte karyotypische Veränderungen mit einer charakteristischen Zellwandzusammensetzung assoziiert?

Die eingängliche Analyse der Laborstämme hatte einen möglichen Zusammenhang zwischen karyotypischen Alterationen und der quantitativen Zusammensetzung der Zellwand ergeben. Im Folgenden sollte daher überprüft werden, ob bestimmte Karyotypen mit einem charakteristischen Polymergehalt der Zellwand einhergehen (Tabelle 7). Tatsächlich fanden sich bei Isolaten mit einem erniedrigten und/oder erhöhten Polymergehalt vermehrt der Karyotyp A(I). Isolate mit erniedrigtem Polymergehalt zeigten vermehrt aberrante Karyotypen, die jedoch keine gemeinsamen chromosomalen Veränderungen besaßen. Bei den karyotypisch aberranten Isolaten mit erhöhtem Glukangehalt konnten hingegen sowohl in der niedermolekularen, als auch in der mittleren Bandenfraktion charakteristische Aberrationen beobachtet werden (Abbildung 25). Die karyotypisch aberranten Isolate EU0283 und EU0357 waren darüber hinaus jeweils in zwei Polymerkategorien zu finden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Karyotyp und einer charakteristischen Zellwandkomposition ist daher gegeben.

**Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Karyotypen von Isolaten mit überdurchschnittlich niedrigem und/oder hohem Zellwand-Polymergehalt**

	n Isolate	KT A(I)	KT B(I)	KT aberrant	KT A aberrant	KT B aberrant
<b>Gesamt Kollektiv</b>	124	32%	33%	35%	12%	23%
<b>FACS gesamt</b>	30	40%	20%	40%	10%	30%
<b>Ch (-)</b>	4	50%	-	50%	25%	25%
<b>Ch (+)</b>	8	63%	12%	25%	-	25%
<b>Gl (-)</b>	2	-	-	100%	50%	50%
<b>Gl (+)</b>	7	58%	14%	28%	-	28%

KT A(I) = Anteil der Isolate mit dem Referenzkaryotyp A(I), KT B(I) = Anteil der Isolate mit dem Referenzkaryotyp B(I), KT aberrant = Gesamtheit aller Isolate mit aberrantem Karyotyp, KT A aberrant = Anteil von Isolaten mit aberrantem A-Karyotyp an der Gesamtheit aller Isolate, KT B aberrant = Anteil von Isolaten mit aberrantem B-Karyotyp an der Gesamtheit aller Isolate, FACS = durchflusszytometrisch quantifizierte Isolate, Ch = Chitingehalt der Zellwand, Gl = Glukangehalt der Zellwand, (-) = niedriger Polymergehalt, (+) = hoher Polymergehalt



**Abbildung 25: Karyogramme von Isolaten mit aberrantem Karyotyp und erniedrigtem und/oder erhöhtem Zellwandgehalt an Chitin (Ch (-)/(+)) - und/oder Glukan (GI (-)/(+))**  
 Verglichen mit den drei Referenzkaryotypen C(I), A(I) und B(I) ähnliche Aberrationen innerhalb einer Gruppe mit spezifischem Polymergehalt, die bei mehr als einem Isolat ungleichen Karyotyps gefunden werden konnten, wurden mit einem gleichen Symbol markiert.

### 3.2.3.2 Multilokus-Sequenztypisierung

#### 3.2.3.2.1 Vergleich der molekularen mit der karyotypischen Phylogenie

Um eine Aussage über Zusammenhänge zwischen dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad auf Sequenzebene und Gemeinsamkeiten im Karyotyp der klinischen Isolate treffen zu können, wurden 84 ausgewählte Isolate mittels MLST typisiert. Darunter waren zwanzig repräsentative Isolate der Karyotyp-Gruppe A(I), einundzwanzig repräsentative Isolate der Karyotyp-Gruppe B(I), sowie alle 43 Isolate, die zusätzliche chromosomale Aberrationen aufwiesen.

Nach Auswertung der Sequenzdaten ließen sich die untersuchten klinischen Isolate in sechzehn MLST-Haupt- und Sub-Kladen unterteilen (Abbildung 26).

Die bei der elektrophoretischen Karyotypisierung vorgenommene Einteilung anhand der Bande des Chromosoms I in die Gruppen A und B ließ sich bei der Verteilung der Isolate auf die einzelnen Klade wieder finden: Bis auf drei Ausnahmen (EU0027, EU0038, EU0102) besaßen alle Isolate der MLST-Kladen 1 - 4 das Chromosom I (Abbildung 26 A). Mit Ausnahme der MLST-Klade 2, in der sich ausschließlich aberrante Isolate befanden, setzten sich diese Klade jeweils zur Hälfte aus aberranten Isolaten und Isolaten des Referenz-Karyotyps A(I) zusammen. Demgegenüber wurden die MLST-Kladen 5 - 9 ausnahmslos von Isolaten gebildet, die das Chromosom I nicht besaßen

(Abbildung 26 B). Die Isolate mit dem Referenz-Karyotyp B(I) fanden sich hierbei zum größten Teil in der MLST-Klade 9, die gleichzeitig die größte aller Kladen darstellte. Die MLST-Kladen 5 - 8 bestanden hingegen vornehmlich aus Isolaten mit aberranten Karyotypen.

Innerhalb der einzelnen Kladen und ihren Untergruppen ließen sich darüber hinaus weitere Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Karyogramme beobachten. So fanden sich beispielsweise alle Vertreter des Karyotyps B(VI) in der MLST-Klade 5 wieder. Des Weiteren zeigten alle Isolate dieser Klade neben dem Verlust, bzw. einer mutmaßlichen Größenveränderung im Sinne eines Banden-Shifts der Chromosom G-entsprechenden Bande eine Signalverstärkung/Doppelbande im Bereich der dem Chromosom H-entsprechenden Bande. Drei von vier Vertretern des Karyotyps B(X) fanden sich in der MLST-Sub-Klade 8a und innerhalb der Sub-Klade 1b zwei aberrante Isolate identischen Karyotyps. In der Sub-Klade 1a fanden sich hingegen nur Isolate des Referenz-Karyotyps A(I).

### **3.2.3.2 Zeigen in der Sequenztypisierung isogene Isolate Ähnlichkeiten im Phänotyp und in der Zellwandzusammensetzung?**

Um zu überprüfen, ob bestimmte Phänotypen gehäuft in bestimmten MLST-Kladen auftreten, wurden nachfolgend die jeweiligen prozentualen Anteile der unterschiedlichen Phänotypen einer Klade berechnet und diese dann mit der prozentualen Verteilung im Gesamt-Kollektiv verglichen. (Tabelle 8, Abbildung 26 A und B). Die Isolate der MLST-Klade 1 wiesen vermehrt einen hypersuszeptiblen Phänotyp, bei gleichzeitig relativ vermindert vertretenem intermediären und hyposuszeptiblen Phänotyp gegenüber den Zellwanddestabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot auf. Bei den Antimykotika dominierte hingegen der intermediäre Phänotyp, bei gleichzeitig vermindert vertretenem hyper- und hyposuszeptiblen Phänotypen.

Die Isolate der MLST-Klade 5 wiesen gegenüber den Zellwanddestabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot vermehrt hyposuszeptible und grenzwertig-hyposuszeptible Phänotypen auf. Während die Antimykotika-Phänotypen für Caspofungin eine Verteilung entsprechend der Verteilung im Gesamtkollektiv zeigten, fand sich für Fluconazol

interessanterweise eine deutliche Überrepräsentation des hyposuszeptiblen Phänotyps. Auch die übrigen Isolate dieser Klade zeigten mehrheitlich einen grenzwertig hyposuszeptiblen Phänotyp ((iii), Abbildung 26 B). Darüber hinaus zeigten die durchflusszytometrisch quantifizierten Isolate dieser Klade einen erhöhten Glukangehalt der Zellwand.

Da alle Isolate zusätzlich über eine charakteristische Aberration im Bereich der Chromosomen G und H verfügten, könnte hier ein möglicher Zusammenhang zwischen Phylogenie, Phänotyp und in der Zellwandkomposition bestehen. Die MLST-Klade 9 zeigte wiederum für alle getesteten Substanzen eine mit dem Gesamtkollektiv weitestgehend identische phänotypische Verteilung.

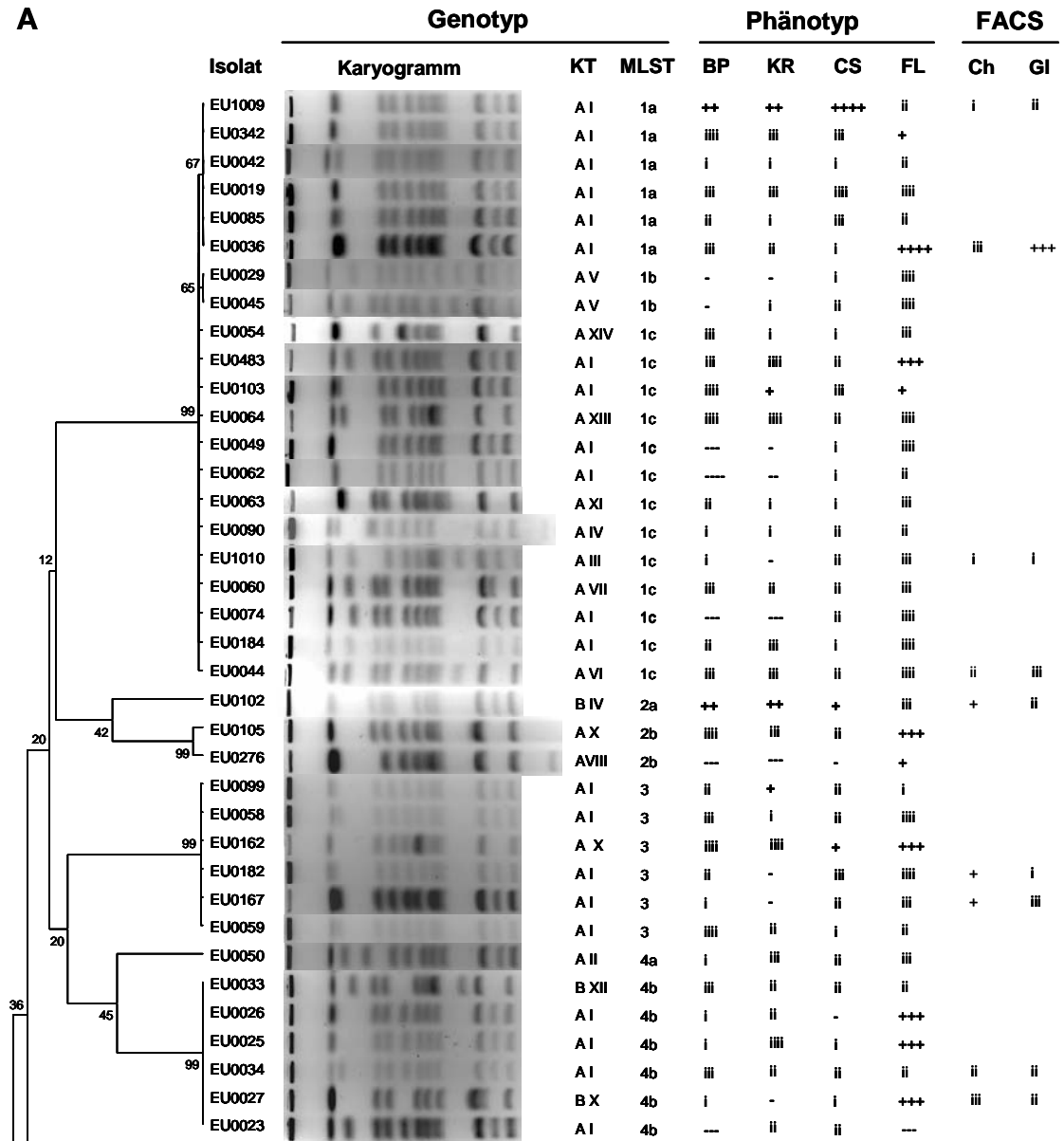
Die restlichen Kladen besaßen vermehrt Isolate mit intermediären Phänotypen. Die Isolate der Klade 4 zeigten allerdings für Fluconazol vermindert intermediäre, bei gleichzeitig vermehrt vertretenen hyper- und hyposuszeptiblen Phänotypen.

**Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen auf die MLST-Kladen**

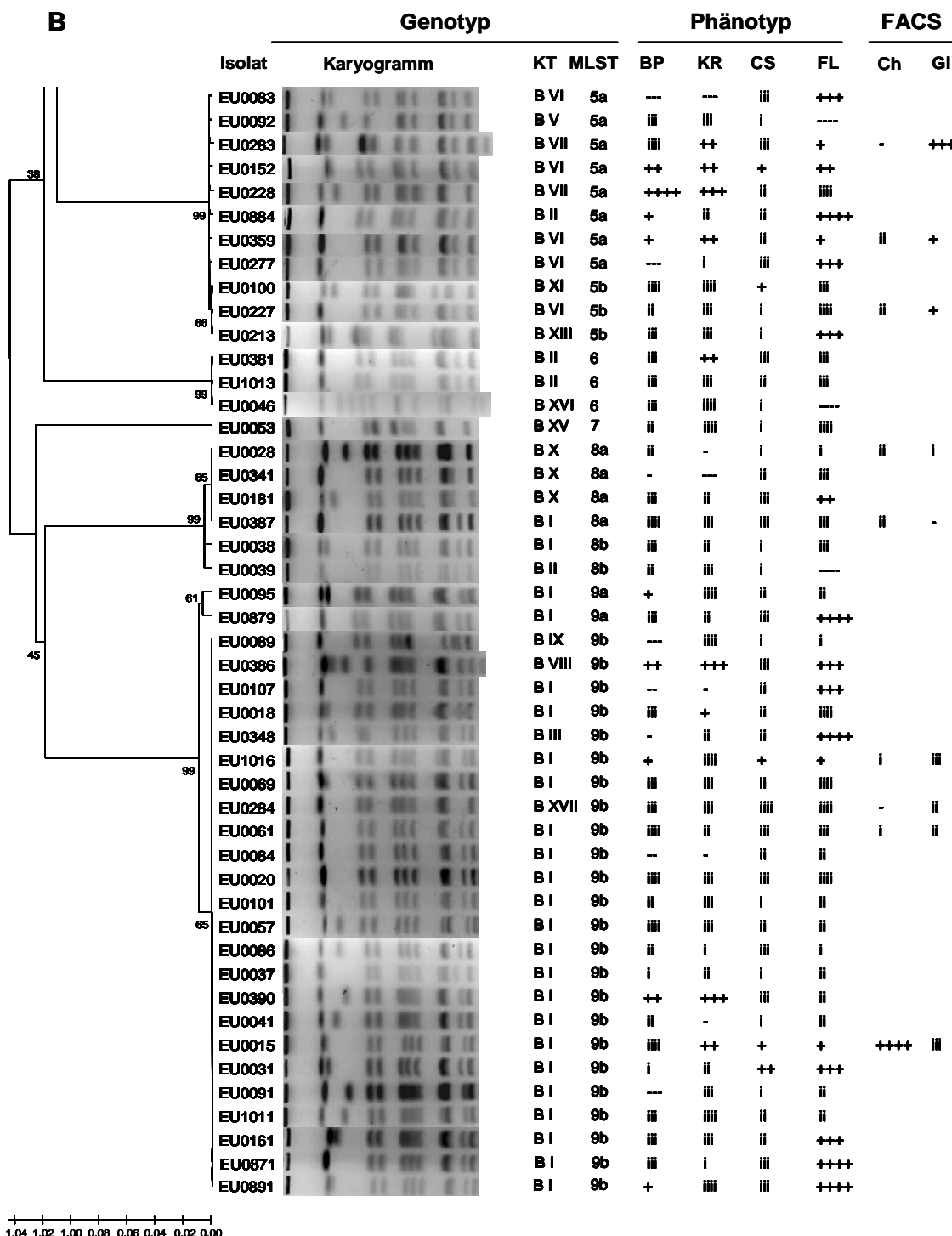
	MLST 1	MLST 2	MLST 3	MLST 4	MLST 5	MLST 6	MLST 7	MLST 8	MLST 9	MLST gesamt	Gesamt- Kollektiv
<b>Isolate</b>	21	3	6	7	11	3	1	7	25	84	124
<b>BP (-)</b>	24%	33%	-	14%	25%	-	-	14%	23%	20%	16%
<b>BP (i)</b>	66%	33%	100%	86%	50%	100%	100%	86%	59%	69%	72%
<b>BP (+)</b>	10%	33%	-	-	25%	-	-	-	18%	11%	12%
<b>KR (-)</b>	24%	33%	20%	14%	12%	-	-	14%	14%	20%	13%
<b>KR (i)</b>	66%	33%	40%	86%	50%	66%	100%	86%	68%	64%	73%
<b>KR (+)</b>	10%	33%	20%	-	38%	33%	-	-	18%	16%	14%
<b>CS (-)</b>	-	33%	-	14%	-	-	-	-	-	3%	3%
<b>CS (i)</b>	95%	33%	100%	86%	87%	100%	100%	100%	86%	89%	85%
<b>CS (+)</b>	5%	33%	-	-	13%	-	-	-	14%	8%	12%
<b>FL (-)</b>	-	-	-	14%	1%	33%	-	14%	-	5%	6%
<b>FL (i)</b>	81%	33%	83%	43%	36%	66%	100%	57%	64%	62%	61%
<b>FL (+)</b>	19%	66%	17%	43%	63%	-	-	29%	36%	33%	33%

MLST 1-9 = Klade der MLST, MLST gesamt = Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen unter allen sequenzierten Isolaten, Gesamtkollektiv = Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen im Gesamtkollektiv, BP = Blancophor P, KR = Kongorot, CS = Caspofungin, FL = Fluconazol, (-) = hypersuszeptibler Phänotyp, (i) = intermediärer Phänotyp, (+) = hyposuszeptibler Phänotyp

A







**Abbildung 26: Phylogenie und Phänotyp der klinischen Isolate**

(A) Genotyp, Phänotyp und Zellwandpolymergehalt der Isolate der MLST-Kladen 1-4, (B) Genotyp, Phänotyp und Zellwandpolymergehalt der Isolate der MLST-Kladen 5-9. Das aus den Sequenzdaten der MLST generierte Dendrogramm wurde mit der MEGA 4 Software mittels der Neighbor-Joining-Methode erstellt. Die Zahlen an den Knotenpunkten des Dendrogramms zeigen Bootstrap-Werte an, die mit jeweils 1000 Randomisierungen berechnet wurden. KT = Karyotyp, MLST = phylogenetische Klade der MLST, BP = Blancophor P, KR = Kongorot, CS = Caspofungin, FL = Fluconazol, FACS = Durchflusszytometrisch quantifizierter Polymergehalt der Zellwand, Ch = Chitingehalt der Zellwand, Gl = Glukangehalt der Zellwand. (-) - (----) = hypersuszeptibler Phänotyp/niedriger Polymergehalt, (i) - (iiii) = intermediärer Phänotyp/mittlerer Polymergehalt, (+) - (++++) = hyposuszeptibler Phänotyp/hoher Polymergehalt

Somit bestätigte sich in dem charakterisierten Kollektiv klinischer Isolate die bereits bei den Laborstämmen beobachtete hohe Variabilität von *C. glabrata* auf phänotypischer, Zellwand-biochemischer und phylogenetischer Ebene. Trotz Isogenie im Sequenztyp zeigten Isolate nahezu aller MLST-Kladen eine Vielzahl von phäno- und karyotypischen Merkmalen unterschiedlichster Ausprägung.

## 4 Diskussion

*Candida spp.* stellen mittlerweile die viert-häufigste aus Blutkulturen isolierte Organismusgruppe dar (BORG VON ZEPELIN *et al.*, 2007). Die dabei nach *C. albicans* an zweiter Stelle stehende Hefe *C. glabrata* ist ein opportunistisches Pathogen von zunehmender klinischer Bedeutung (BORG VON ZEPELIN *et al.*, 2007). *C. glabrata* kann sowohl oberflächliche Schleimhautinfektionen, als auch tiefe Organmykosen und somit lebensbedrohliche systemische Erkrankungen verursachen. Seine intrinsische Resistenz gegenüber Azol-Antimykotika macht das Erwägen alternativer Behandlungsstrategien erforderlich. Darüber hinaus verfügt *C. glabrata* neben einer sehr dynamischen, für den Pathogenitätsprozeß wichtigen Zellwand über eine hohe Genomflexibilität (FISCHER *et al.*, 2006). Für *C. albicans* finden sich in der Literatur bereits Indizien dafür, dass eine erhöhte genetische Flexibilität zu Veränderungen in der Stress- und Medikamentenresistenz von humanpathogenen Hefen führen kann. Genmutationen und chromosomale Aneuploidie können sowohl mit der Entstehung klinischer Resistenzen (BALASHOV *et al.*, 2006; SELMECKI *et al.*, 2008), als auch mit veränderten Zellwand-Phänotypen von Laborstämmen und klinischen Isolaten in Verbindung stehen (AHMAD *et al.*, 2008; ANGIOLELLA *et al.*, 2008). Populationsgenetische Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass Antimykotikaresistenzen gehäuft in phylogenetisch isogenen Kladen auftreten können (DODGSON *et al.*, 2004; PUJOL *et al.*, 2003).

Die Adaptionsmechanismen und Virulenzfaktoren von *C. glabrata* sind dagegen nach wie vor nur unvollständig erforscht. Anhand von (i) phänotypischen Untersuchungen, (ii) biochemischen Analysen der Zellwandkomposition und (iii) des Genotyps sollten mögliche Zusammenhänge zwischen Zellwandphänotypen und –zusammensetzung, Genomaberrationen sowie Resistenz gegenüber Antimykotika bei *C. glabrata* charakterisiert werden. Dazu standen zwei unterschiedliche Stamm-Kollektive zur Verfügung. Zum einen 10 isogene Klone des weltweit verwendeten Labor-Referenzstamms *C. glabrata* ATCC2001/CBS138 die aus unterschiedlichen Forschungslaboratorien zusammengetragen wurden und zum anderen ein heterogenes Kollektiv von

124 klinischen *C. glabrata* Isolaten aus verschiedenen europäischen klinischen Zentren.

#### 4.1 Phänotypische Charakterisierung der Kollektive

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden beide Kollektive auf Empfindlichkeit gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Calcofluor Weiß, Blancophor P und Kongorot, sowie den klinisch bedeutsamen Antimykotika Caspofungin und Fluconazol getestet.

Die zur Stoffgruppe der Diaminostilbene gehörenden Substanzen Calcofluor Weiß und Blancophor P binden an das Chitin der Zellwand und zerstören so dessen mikrofibrilläre Struktur. Der Azofarbstoff Kongorot hemmt dagegen das Wachstum von Hefen durch Bindung an das  $\beta$ -1,3-Glukan der Zellwand. Die Testung gegenüber diesen Substanzen erlaubt daher indirekte Rückschlüsse auf die Zellwandkomposition. Das Antimykotikum Caspofungin beeinflusst ebenfalls die Integrität der Zellwand, indem es die Fähigkeit des Pilzes zur Synthese von  $\beta$ -1,3-Glukan inhibiert. Das klinisch eingesetzte Triazol Fluconazol wirkt hingegen durch die Inhibition der Synthese des essentiellen Plasmamembranbestandteils Ergosterol fungistatisch.

Auf diese Weise sollte einerseits untersucht werden, ob Zusammenhänge in der Empfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Zellwand-aktiven Substanzen bestehen und andererseits, inwiefern die Toleranz gegenüber Zellwandstress einen Einfluss auf die Antimykotikaresistenz besitzt.

Aufgrund der phänotypischen Merkmale konnte das Laborstammkollektiv in drei Untergruppen eingeteilt werden: Gruppe 1 zeigte gegenüber allen getesteten Substanzen eine signifikant höhere Empfindlichkeit als die Stämme der Gruppen 2 und 3. Die Gruppe 2 unterschied sich wiederum von Gruppe 3 durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen, bei gleich hoher Antimykotikatoleranz. Die Toleranz der Laborstämme gegenüber Diaminostilbenen und Kongorot stand dabei in einem linearen Abhängigkeitsverhältnis.

Die phänotypische Analyse der klinischen Isolate ergab eine Streuung der Messwerte entsprechend einer Gauß'schen Normalverteilung innerhalb der

getesteten Konzentrationsbereiche. Die Testung der Caspofungin-Toleranz zeigte zwar ebenfalls eine Normalverteilung, allerdings lagen die Messwerte in einem engeren Konzentrationsbereich von lediglich sechs Titerstufen der verwendeten Verdünnungsreihe bis maximal 2 µg/ml. Diese Verteilung deckt sich mit den Ergebnissen anderen Studien zur Empfindlichkeit von *Candida spp.* gegenüber Caspofungin, bei denen bis zu 99,9 % aller Isolate eine MHK von  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  aufwiesen (ESPINELL-INGROFF, 2008; PFALLER *et al.*, 2008).

Bei der Testung auf Fluconazol zeigte sich jedoch verglichen mit der Toleranz von Azol-suszeptiblen Hefen, wie z.B. *C. albicans*, eine Rechtsverschiebung des Toleranzprofils in Richtung des hyposuszeptiblen Bereichs, was sich auf die bekannte intrinsische Resistenz gegenüber Azol-Antimykotika von *C. glabrata* zurückführen lässt (HOF, 2003).

Wie bereits für die Laborstämme beschrieben, zeigte sich für die Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber den Zellwanddestabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot ebenfalls ein lineares Abhängigkeitsverhältnis. Für *C. albicans* konnte bereits gezeigt werden, dass Azol- und Echinocandin-resistente Stämme über Gemeinsamkeiten sowohl auf phäno- und genotypischer Ebene, als auch im Zellwandaufbau und in der Virulenz verfügen können (ANGIOLELLA *et al.*, 2008; SCHUETZER-MUEHLBAUER *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse stützen somit die Annahme, dass auch bei *C. glabrata* ein Zusammenhang zwischen Zellwandkomposition und Antimykotikaresistenz bestehen könnte.

Unter Einbeziehung der klinischen *C. glabrata*-Isolate ließ sich jedoch kein signifikanter globaler Zusammenhang zwischen Zellwand-Phänotypen und Antimykotikaresistenz nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass die in dem untersuchten Kollektiv vorhandenen klinischen Resistenzen in der Mehrheit auf induzierbare enzymatische Mechanismen und/oder Ereignisse auf genetischer Ebene zurückzuführen sind, die nicht unmittelbar mit der Zellwand in Zusammenhang stehen (ANGIOLELLA *et al.*, 2008; FIDEL *et al.*, 1999; MORSCHHÄUSER J., 2003; VANDEN BOSSCHE *et al.*, 1992).

## 4.2 Biochemische Analyse der Zellwände ausgewählter Laborstämme und klinischer Isolate

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Phänotyp-Gruppen der Laborstämme und innerhalb der Normalverteilung der klinischen Phänotypen führten zu der Fragestellung, ob die unterschiedliche Toleranz gegenüber Zellwandstress und Antimykotika durch eine charakteristische Zellwandkomposition erklärt werden kann. Hinweise darauf lieferten auch andere Arbeitsgruppen durch die phänotypische Charakterisierung von Deletionsmutanten, die in ihrer Fähigkeit zur Chitin- und Glukan-Synthese beeinträchtigt waren. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Toleranz gegenüber Diaminostilbenen wie Blankophor P aus einem erniedrigten Gehalt an Chitin in der Zellwand resultieren kann (BULAWA *et al.*, 1995). Ein herabgesetzter Glukangehalt oder eine ungenügende Vernetzung des  $\beta$ -1,3-Glukans kann andererseits zu einer Hypersuszeptibilität gegenüber Kongorot führen (PARDINI *et al.*, 2006). Chitinreiche Zellen sollten daher einen hypersuszeptiblen Phänotyp gegenüber Diaminostilbenen zeigen, glukareiche Zellen einen hyposuszeptiblen Phänotyp gegenüber Kongorot. Demzufolge könnte die für beide Kollektive beschriebene lineare Abhängigkeit gegenüber diesen Substanzen bedeuten, dass Stämme mit einem niedrigen Chitingehalt prinzipiell über einen hohen Glukangehalt verfügen könnten und *vice versa*.

Darüber hinaus sind sowohl für *S. cerevisiae*, als auch für *C. albicans* Kompensationsmechanismen bei der Adaption an Zellwandstress beschrieben worden, wie er in ähnlicher Weise auch durch die Inkubation mit Zellwandaktiven Substanzen wie Diaminostilbenen, Kongorot oder Caspofungin verursacht wird. So führt beispielsweise eine Deletion der Glukansynthese Fks1 in *S. cerevisiae* durch verstärkte Aktivität der Chitinsynthese Chs3p zu einem erhöhten Chitingehalt der Zellwand (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Eine weitere zentrale Bedeutung kommt den Chitinsynthesen Chs2p und Chs8p zu (WALKER *et al.*, 2008), deren Homologe auch in *C. glabrata* zu finden sind.

Um diese möglichen Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen und einer spezifischen Zellwandzusammensetzung zu untersuchen, wurden die

strukturellen Zellwand-Hauptkomponenten Chitin und Glukan bei repräsentativ ausgewählten Isolaten mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt.

Die ausgewählten Isolate beider Kollektive zeigten dabei signifikante Unterschiede sowohl im Chitin-, als auch im Glukangehalt. Die Stämme der drei Phänotypgruppen des Laborstammkollektivs verfügten jeweils über eine charakteristische Zellwandkomposition. Der Glukangehalt war in Gruppe 1 am höchsten und in Gruppe 3 am niedrigsten, der Chitingehalt hingegen in Gruppe 3 am höchsten. Entgegen der eingangs formulierten Hypothese ging die erhöhte Toleranz gegenüber Zellwand-aktiven Substanzen und Antimykotika der Laborstämme der Phänotyp-Gruppen 2 und 3 mit einem erniedrigten Glukan- und einem erhöhten Chitingehalt einher.

Bei den analysierten klinischen Isolaten konnte zunächst analog zu den phänotypischen Tests eine Normalverteilung des jeweiligen Polymergehalts beobachtet werden. Ein generelles Abhängigkeitsverhältnis zwischen dem Chitin- und Glukangehalt der Isolate konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Interessanter Weise war eine tendenzielle Korrelation von erhöhter Fluconazol-Toleranz und erhöhtem Glukangehalt erkennbar. Dieser Zusammenhang könnte durch eine verstärkte Barrierefunktion der Zellwand erklärt werden, welche das Eindringen von Fluconazol in die Zelle erschwert. In der Literatur ist diesbezüglich beschrieben, dass in Biofilm-Formation wachsende Hefen über einen bis zu 10-fach erhöhten Glukangehalt der Zellwand verfügen können, der mit einer bis zu 1000-fach erhöhten Antimykotikatoleranz einhergehen kann (CATEAU *et al.*, 2008; NETT *et al.*, 2007).

Für die restlichen untersuchten Substanzen zeigte sich jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen Zellwandzusammensetzung und den phänotypischen Eigenschaften der klinischen Isolate auf globaler Ebene. Bei der Überprüfung auf mögliche Abhängigkeiten des jeweiligen Zellwandpolymergehalts mit den Ergebnissen aus den phänotypischen Tests zeigte sich für keine der getesteten Substanzen eine signifikante Korrelation. Der bei der quantitativen Analyse der Zellwände der Laborstämme beobachtete Zusammenhang zwischen erniedrigtem Glukangehalt und erhöhter Toleranz gegenüber Zellwandstressoren und Antimykotika ließ sich in dem hier untersuchten Kollektiv klinischer Isolate nicht wieder finden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen daher, dass die beobachteten phänotypischen Unterschiede der klinischen Isolate nur bedingt durch einzelne Veränderungen im Gehalt der Zellwand an Chitin und Glukan zu erklären sind. So wird die enorme Dynamik und Plastizität der Zellwand durch ein komplex reguliertes Zusammenspiel der für die Synthese und den Abbau der verschiedenen Zellwand-Komponenten benötigten Enzyme bedingt. Ein Großteil dieser Enzyme ist dabei in der Zellwand selbst lokalisiert. Diese Zellwandproteine sind u.a. für die Verknüpfung, Elongation und Quervernetzung der verschiedenen Komponenten verantwortlich. Die Expression und Aktivität dieser Proteine ist dabei abhängig von dem die Hefezelle umgebenden Milieu (AGUILAR-USCANGA und FRANCOIS, 2003; CABIB *et al.*, 2008; POPOLLO *et al.*, 1997; SELVAGGINI *et al.*, 2003).

Sollte beispielsweise nicht die absolute Polymerquantität, sondern vielmehr die effiziente Vernetzung der einzelnen Monomere miteinander und an die anderen Zellwandkomponenten für ein verändertes phänotypisches Profil verantwortlich sein, könnte dies einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachteten Phänomene bieten.

Dies lässt darauf schließen, dass phänotypische Tests mit Zellwanddestabilisierenden Substanzen weniger als ein quantitatives, sondern viel mehr als ein qualitatives Maß für die Stabilität der Zellwand unabhängig von der Abundanz ihrer Polymere angesehen werden müssen.

### **4.3 Genotypische Charakterisierung und mögliche Auswirkungen auf Phänotyp und Zellwandzusammensetzung der Kollektive**

Etwa ein Fünftel aller Gene von *C. glabrata* kodieren für Proteine, die direkt oder indirekt in den Zellwandstoffwechsel eingebunden. Aufgrund der hohen genomischen Variabilität von *C. glabrata* könnten Mechanismen wie z.B. chromosomale Duplikationen eine Überexpression der für die Synthese und Vernetzung von Zellwandpolymeren notwendigen Enzyme bewirken. Solche Ereignisse könnten unter bestimmten Bedingungen einen erheblichen Selektionsvorteil betroffener Stämme bei der Exposition gegenüber



Zellwandstress verursachenden Substanzen und Antimykotika bedeuten. Zur Untersuchung, ob es einen Zusammenhang zwischen den beobachteten Phänotypen, der Zellwandkomposition und Veränderungen auf Genomebene der Laborstämme und der klinischen Isolate gibt, wurden die beiden Kollektive durch Analyse des Karyotyps mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und der Bestimmung der molekularen Phylogenie durch Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) genotypisch charakterisiert. Hiermit sollte überprüft werden, ob spezifische karyotypische Aberrationen oder der phylogenetische Verwandtschaftsgrad eines Stammes einen charakteristischen Phänotyp gegenüber einer oder mehreren der getesteten Substanzen, sowie eine spezifische Zellwandzusammensetzung bedingen.

Die Karyogramme der PFGE beider Kollektive zeigten im Mittel zwischen 9 und 12 Banden und verschiedenste strukturelle und numerische chromosomale Aberrationen. Bei Banden im Größenbereich von >1600kb kam es häufiger zu Längenpolymorphismen, die möglicherweise auf die *in vitro* Instabilität großer Chromosomen zurückzuführen sind, wie sie z.B. durch Scherkräfte verursachte Strangbrüche sehr großer DNA Fragmente bedingt sein können (SHIN *et al.*, 2007). Darüber hinaus beherbergen die beiden größten Chromosomen L und M die sehr variablen rDNA Loci, deren repetitive Sequenzen in ihrer Länge häufigen Änderungen unterworfen sind (ASAKURA *et al.*, 1991). Wegen dieser methodischen Schwierigkeiten wurden diese Banden bei der Beurteilung der Karyogramme bewusst außer Acht gelassen.

Innerhalb des Laborstamm-Kollektivs konnten tatsächlich drei unterschiedliche Karyotypen identifiziert werden, die mit charakteristischen Phänotypen und einer spezifischen Zellwandkomposition einhergingen: Die Stämme der Phänotypgruppen 2 und 3 zeigten jeweils ein verglichen mit den Karyogrammen der Phänotypgruppe 1 abweichendes Bandenmuster. Da diese Stämme in der MLST als isogen typisiert worden sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich die karyotypischen Veränderungen dieser Stämme in einem kurzen phylogenetischen Zeitfenster ereignet haben müssen und die restlichen genotypischen Merkmale dieser Stämme weitgehend unverändert sind. Für die umschriebene Gruppe der Laborstämme mit einer kurzen evolutionären Distanz in der molekularen Phylogenie, ist es daher wahrscheinlich, dass die jeweiligen Phänotypen und Zellwandzusammensetzungen tatsächlich auf die

beobachteten karyotypischen Veränderungen zurückzuführen sind. Diese Hypothese wird zusätzlich durch Studien gestützt, die zeigen konnten, dass es in isogen typisierten Isolaten aus sequentiell abgenommenen Blutkulturen eines Patienten zum rapiden Auftreten karyotypischer Variationen verbunden mit einer veränderten Azol-Toleranz im Sinne von Mikroevolution in *C. glabrata* kommen kann. (CORMICAN *et al.*, 1996; SHIN *et al.*, 2007).

Die Genotypisierung der klinischen Isolate mittels PFGE zeigte zunächst eine Aufteilung in die zwei karyotypischen Hauptgruppen A und B. In Gruppe A befanden sich alle Isolate, welche das Chromosom I besaßen, in Gruppe B alle Isolate, die das Chromosom I nicht besaßen. Innerhalb dieser beiden karyotypischen Gruppen zeigte ein Drittel der Isolate den Karyotyp A(I), ein Drittel den Karyotyp B(I) und ein Drittel vergleichsweise stark aberrante Karyotypen (A(II) - A(XIV) und B(II) - B(XVIII)). A(I) und B(I) bildeten somit die karyotypisch größten klonalen Gruppen innerhalb des untersuchten Kollektivs.

Interessanterweise ließ sich die bei der elektrophoretischen Karyotypisierung beobachtete Aufteilung in zwei Hauptgruppen bei der Verteilung der sequenzierten Isolate auf die insgesamt neun MLST-Haupt-Kladen wieder finden. Dabei fanden sich in den MLST-Kladen 1-4, bis auf drei Ausnahmen, Isolate der Karyotyp-Gruppe A, in den MLST-Kladen 5-9 ausschließlich Isolate der Karyotyp-Gruppe B. Einer der sequenzierten Loci, *URA3*, scheint mit dieser Beobachtung in Verbindung zu stehen, da er auf dem Chromosom I lokalisiert ist. Dodgson *et al.* konnten zeigen, dass bei Verlust der Chromosom I entsprechenden Bande in der PFGE, der den *URA3*-tragende Genabschnitt mit einem Chromosom der hochmolekularen Fraktion fusioniert (DODGSON *et al.*, 2005). Auch hier war die Lokalisation des *URA3*-Lokus Kladen-abhängig, was die Hypothese von zwei durch dieses Merkmal phylogenetisch unterscheidbaren Subpopulationen zusätzlich untermauert. Zeitgleich mit dieser Arbeit konnten mittels Typisierung anhand von Mikrosatelliten-DNA eines 200 Stämme umfassenden internationalen Kollektivs die beiden Karyotypen A(I) und B(I) als die zwei größten klonalen *C. glabrata*-Populationen auch von anderen bestätigt werden (BRISSE *et al.*, 2009). Diese beiden Karyotypen stellen zugleich die phylogenetisch ältesten chromosomalen Konfigurationen dar, die sich auf einen gemeinsamen Vorfahren von *C. glabrata* und der eng

verwandten Bäckerhefe *S. cerevisiae* zurückführen lassen (MULLER H *et al.*, 2009).

Neben den beiden Karyotypen A(I) und B(I) konnten in den beiden Hauptgruppen A und B insgesamt 30 weitere Karyotyp-Subgruppen gefunden werden, deren Bandenmuster sich von A(I) und B(I) in mindestens einem weiteren karyotypischen Merkmal unterschied. Die für diese Karyotypen charakteristischen, phylogenetisch mutmaßlich jüngeren Aberrationen könnten im Rahmen von spontanen Anpassungsprozessen entstanden sein.

Im Gegensatz zu dem Laborstammkollektiv zeigte sich bei den klinischen Isolaten bei den meisten isogenen MLST-Kladen eine ausgeprägte phäno- und karyotypische Variabilität. Eine globale phylogentische Abhängigkeit der untersuchten phänotypischen Eigenschaften oder der Zellwandzusammensetzung bestand dabei nicht. Eine Ausnahme bildete die MLST-Klade 5. Ähnlich wie bei den phylogenetisch eng verwandten Laborstämmen fanden sich hier isogene Isolate, die über phäno- und karyotypische Gemeinsamkeiten verfügten. Neben einer vergleichsweise erhöhten Azoltoleranz und einer vermehrten Hyposuszeptibilität gegenüber Zellwand-aktiven Substanzen besaßen die Isolate dieser Klade eine gemeinsame charakteristische chromosomale Aberration in der mittleren Bandenfraktion der Karyogramme. Die durchflusszytometrisch analysierten Isolate dieser Klade zeigten zusätzlich einen erhöhten Glukangehalt der Zellwand.

Darüber hinaus besaßen drei Isolate mit hyposuszeptiblen Fluconazol-Phänotyp ein Minichromosom im niedermolekularen Bereich unterhalb der Chromosom A Bande. Polakova *et al.* konnten unlängst zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Erwerb eines Minichromosoms und erhöhter Azoltoleranz bestehen kann (POLAKOVA *et al.*, 2009).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass komplexe Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen, der quantitativen Zellwandzusammensetzung und spezifischen genotypischen Charakteristika bestehen. Die an den untersuchten Laborstämmen und den Isolaten der Klade 5 dargestellten Abhängigkeiten, bilden somit den Ausgangspunkt für die gezielte weiterführende molekularbiologische Erschließung der Pathogenität

von *C. glabrata*. Beispielsweise kann jetzt durch *in situ*-Hybridisierungstechniken, Mikroarrays und komparative genomische Analysen der Verbleib von Chromosomenfragmenten und der resultierende Einfluss auf betroffene Genfunktionen charakterisiert werden.

Durch eine Steigerung der Auflösung der Genotypisierungsmethoden von *C. glabrata* könnten zudem weitere genetische Veränderungen sichtbar gemacht werden, die bislang weder mit der PFGE, noch mit der MLST zu erfassen sind. Hierdurch können dann schrittweise komplexere Zusammenhänge zwischen Phänotyp, Zellwand und genetischer Flexibilität dargestellt werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Erhöhung der diskriminatorischen Kapazität der PFGE durch die Vorbehandlung der DNA-Proben mit speziellen Restriktionsendonukleasen erreicht werden kann (CHEN KW *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2007). Durch dieses Vorgehen ließen sich dann diskrete genetische Unterschiede darstellen, welche im Rahmen von mikroevolutionären Ereignissen entstanden sind.

Die erhobenen Daten dieser Arbeit belegen die hohe genomische Plastizität, die es *C. glabrata* ermöglicht, durch schnelle genotypische Variation sich flexibel an sich ändernde Umweltbedingungen zu adaptieren. Neben der grundlegenden Bedeutung dieser Daten für die Virulenz und die antimykotische Therapie von *C. glabrata*-Infektionen besitzen die beobachteten schnellen Veränderungen eine wichtige aber bislang wenig berücksichtigte Konsequenz im Hinblick auf die Beurteilung wissenschaftlicher Arbeiten, da spontane genetische Ereignisse und die resultierende phänotypische Variabilität von isogenen Laborstämmen, zu einer falschen Interpretation phänotypischer Daten von Deletionsmutanten führen können. Eine ähnliche Problematik wurde kürzlich auch für *C. albicans* beschrieben (ARBOUR *et al.*, 2009).

## 5 Zusammenfassung

Der Hefepilz *C. glabrata* ist ein opportunistischer humanpathogener Organismus, der die zweithäufigste Ursache für systemische Candidosen bei immunsupprimierten Patienten darstellt. Typische Charakteristika des Erregers sind neben einer intrinsischen Resistenz gegenüber Azolantimykotika, die sehr dynamische Zellwandstruktur und eine hohe genomische Flexibilität. Es wird angenommen, dass diese Eigenschaften es *C. glabrata* ermöglichen, sich in verschiedenen Wirtsnischen perfekt an das umgebende Milieu anzupassen. Darüber hinaus könnten beide Faktoren wichtige Einflußgrößen für die Virulenz und Resistenz des Erregers sein.

Um eine Aussage über die tatsächliche Bedeutung dieser Mechanismen sowohl für die Entstehung und Therapie von Candidosen, als auch für die Interpretation wissenschaftlicher Daten treffen zu können, wurden zwei *C. glabrata*-Kollektive untersucht. Das erste Kollektiv bestand aus in der Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) isogenen Klonen des Labor-Referenzstamms ATCC2001/CBS138, das andere Kollektiv aus 124 heterogenen klinischen Isolaten, die aus unterschiedlichen europäischen Forschungs- und Diagnostikzentren stammten. Die Charakterisierung beider Gruppen erfolgte genotypisch mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und MLST, phänotypisch durch standardisierte Mikrodilutionstests auf Zellwand-destabilisierende und antimykotisch wirksame Substanzen und Zellwand-biochemisch, durch die quantitative Analyse des Chitin- und Glukangehalts mittels Durchflusszytometrie.

Innerhalb des Laborstamm-Kollektivs konnten drei unterschiedliche Karyotyp-Gruppen identifiziert werden, die jeweils mit spezifischen Phänotypen und einer charakteristischen Zellwandkomposition assoziiert waren.

Die klinischen Isolate zeigten in der PFGE insgesamt 32 unterschiedliche Karyotypen und 9 Haupt-Kladen in der MLST. Anhand des elektrophoretischen Karyotyps der Isolate konnte eine Einteilung der Isolate in zwei Hauptgruppen vorgenommen werden, die ebenfalls mit charakteristischen Sequenztypen in der MLST einhergingen.

Im Gegensatz zu den Laborstämmen zeigten phylogenetisch eng verwandte klinische Isolate desselben Karyotyps größtenteils eine breite Variabilität bezüglich phänotypischer Charakteristika und in der Zellwandzusammensetzung.

Jedoch konnte auch eine MLST-Klade identifiziert werden, deren Isolate alle eine charakteristische chromosomale Aberration in der mittleren Bandenfraktion in der PFGE besaßen. Des Weiteren zeigten die Isolate dieser Klade eine vergleichsweise reduzierte Suszeptibilität gegenüber Fluconazol und Zellwanddestabilisierenden Substanzen. Alle durchflusszytometrisch analysierten Isolate dieser Klade verfügten darüber hinaus über einen erhöhten Glukangehalt der Zellwand.

Diese Ergebnisse deuten an, dass komplexe Zusammenhänge zwischen geno- und phänotypischen Charakteristika, sowie einer spezifischen Zellwandzusammensetzung bestehen. Die aufgezeigten Abhängigkeiten stellen somit die Grundlage für neue Erklärungsmodelle zum Verständnis der fungalen Virulenz, der Entstehung von Resistenz, und von essentiellen Adaptionsmechanismen von klinischen *C. glabrata*-Stämmen dar.

Die nachgewiesene hohe genetische Variabilität und die resultierende signifikante Veränderung verschiedener Phänotypen der untersuchten isogenen Laborstämme macht außerdem deutlich, mit welcher großer Vorsicht die Interpretation wissenschaftlicher Daten von erzeugten Deletionsmutanten erfolgen muss.

## 6 Anhang

### 6.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Manifestationen der Candidose	4
Abbildung 2: Phylogenie von <i>C. glabrata</i>	7
Abbildung 3: Phänotypen von <i>C. glabrata</i>	10
Abbildung 4: <i>C. glabrata</i> zeigt unterschiedliche Koloniemorphologien	12
Abbildung 5: Stufen-Schema der Biofilm-Ausbildung	13
Abbildung 6: Zellwandstruktur von <i>C. glabrata</i>	20
Abbildung 7: Verteilungsmuster der E-Test-MHK-Werte von Fluconazol klinischer <i>Candida</i> -Isolate	24
Abbildung 8: Calcufluor-Weiß-Tropftest mit zehn Klonen des Labor-Referenzstamms CBS138 auf YPD-Agar bei pH 8 und einer Wachstumstemperatur von 30°C	61
Abbildung 9: Korrelation der unterschiedlichen Phänotypen gegenüber Zellwand-destabilisierenden und antimykotischen Substanzen	62
Abbildung 10: Quantitative FACS-Analyse des Glukan- und Chitingehalts drei ausgewählter Laborstämme in verschiedenen Wachstumsphasen	65
Abbildung 11: Korrelation der Phänotypen der ausgewählten Laborstämme mit dem jeweiligen Zellwandgehalt an Chitin und Glukan in unterschiedlichen Wachstumsphasen	66
Abbildung 12: Pulsfeld-Gelelektrophorese isogener Laborstämme	67
Abbildung 13: Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot	72
Abbildung 14: Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber dem Zellwand-wirksamen Antimykotikum Caspofungin	73
Abbildung 15: Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol	74

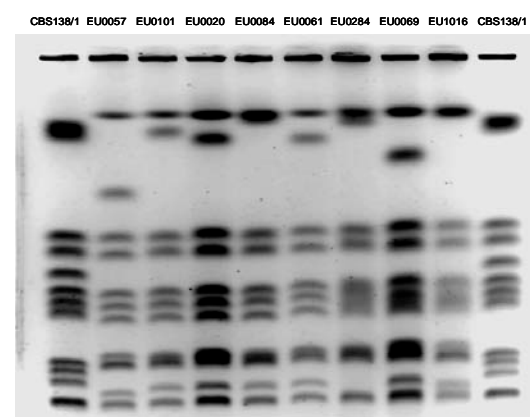
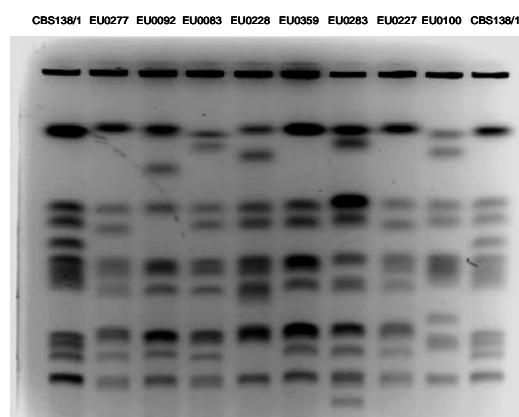
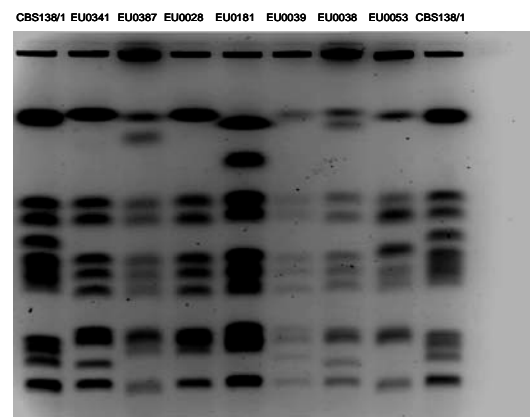
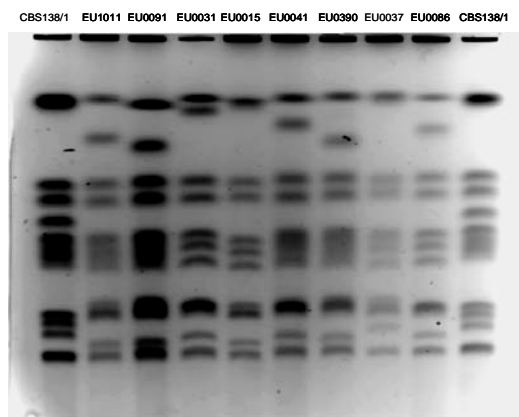
Abbildung 16: Vergleich der Empfindlichkeit der klinischen Isolate gegenüber Blancophor P mit der Empfindlichkeit gegenüber Kongorot	75
Abbildung 17: Überprüfung möglicher Korrelationen der Phänotypen aller klinischen Isolate	77
Abbildung 19: Verteilung des im FACS quantifizierten mittleren Chitin- und Glukangehalts der Zellwände von 30 repräsentativen klinischen Isolaten in der stationären Phase von YPD-Flüssigkultur	79
Abbildung 20: Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs von Chitin- und Glukangehalt aller im FACS quantifizierten klinischen Isolate	80
Abbildung 21: Überprüfung auf mögliche Korrelationen der unterschiedlichen Phänotypen mit dem Chitin- und Glukangehalt von Zellwänden stationärer Phase Zellen einer YPD-Flüssigkultur aller im FACS analysierten klinischen Isolate	81
Abbildung 22: 124 klinische Isolate der Spezies <i>C. glabrata</i> zeigten in der PFGE 32 unterschiedliche Karyotypen	84
Abbildung 23: Klinische Isolate mit chromosomalen Aberrationen der Laborstamm-Karyotypgruppen C(II) und C(III) und ihre Phänotypen	86
Abbildung 24: Karyogramme von Isolaten mit aberrantem Karyotyp und einem hyper - oder hyposuszeptiblen Phänotyp gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Blancophor P und Kongorot, sowie den Antimykotika Caspofungin und Fluconazol	88
Abbildung 25: Isolate mit einem „Minichromosom“ im niedermolekularen Bereich	89
Abbildung 25: Karyogramme von Isolaten mit aberrantem Karyotyp und erniedrigten und/oder erhöhtem Zellwandgehalt an Chitin- und/oder Glukan	91
Abbildung 26: Phylogenie und Phänotyp der klinischen Isolate	96



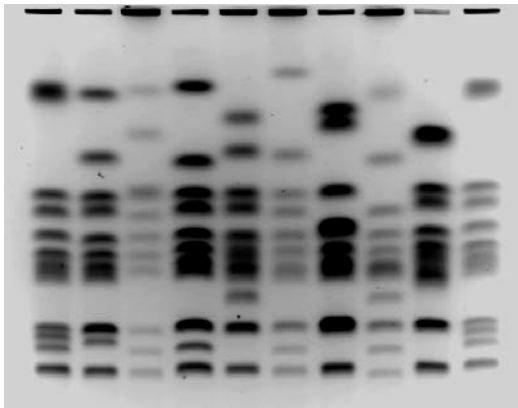
## 6.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Vergleich der Hauptmerkmale von <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> und <i>C. albicans</i>	8
Tabelle 2: <i>C. glabrata</i> -Laborstämme	34
Tabelle 3: Klinische <i>C. glabrata</i> -Isolate und Patientendaten	35
Tabelle 4: MHK-Bereiche von zwei Referenzstämmen	46
Tabelle 5: Wachstumsverhalten der isogenen Laborstämme gegenüber Zellwand-destabilisierenden und antimykotischen Substanzen	61
Tabelle 6: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Karyotypen aller Isolate mit hyper- oder hyposuszeptiblem Phänotyp	87
Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Karyotypen von Isolaten mit überdurchschnittlich niedrigem und/oder erhöhtem Zellwand-Polymergehalt	90
Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Phänotypen auf die MLST-Kladen	93

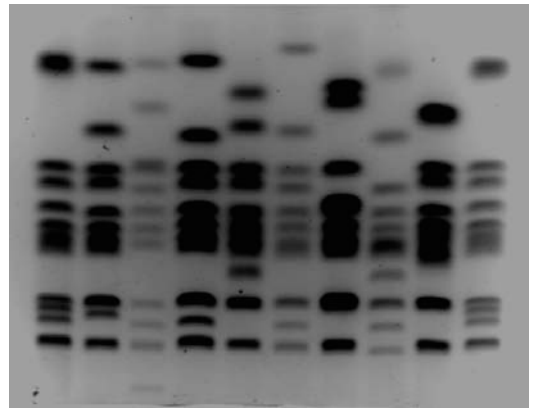
## 6.3 Pulsfeld-Gele



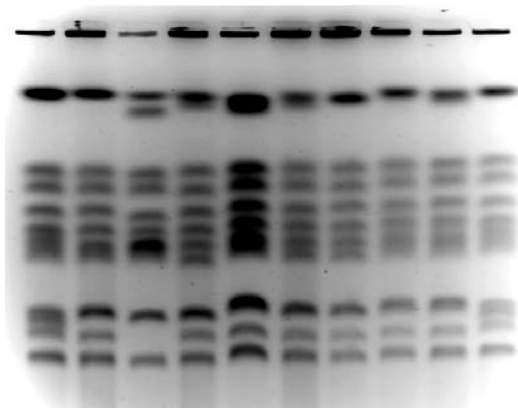
CBS138/1 EU0060 EU0090 EU0074 EU0044 EU0184 EU0054 EU1010 EU0063 CBS138/1



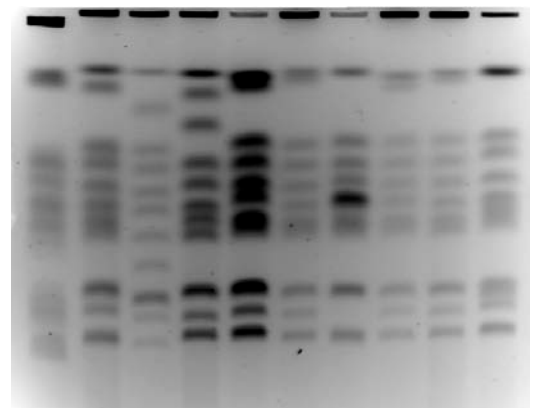
CBS138/1 EU0060 EU0090 EU0074 EU0044 EU0184 EU0054 EU1010 EU0063 CBS138/1



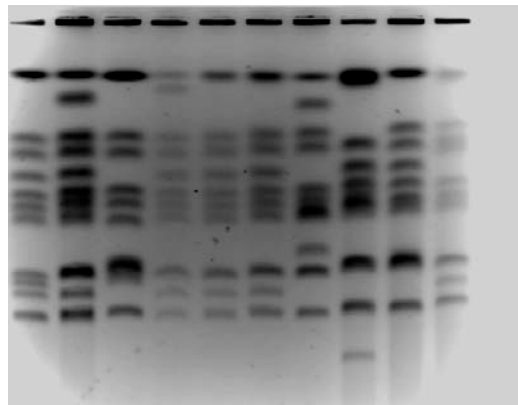
CBS138/1 EU0049 EU0064 EU00103 EU0036 EU0085 EU0019 EU0342 EU1009 CBS138/1



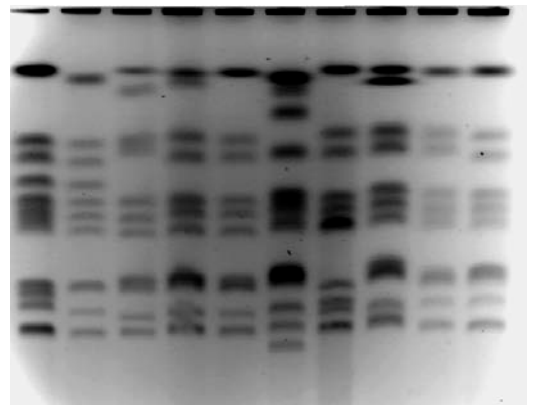
CBS138/1 EU0042 EU0029 EU0050 EU0058 EU0182 EU0099 EU0059 EU0167 CBS138/1



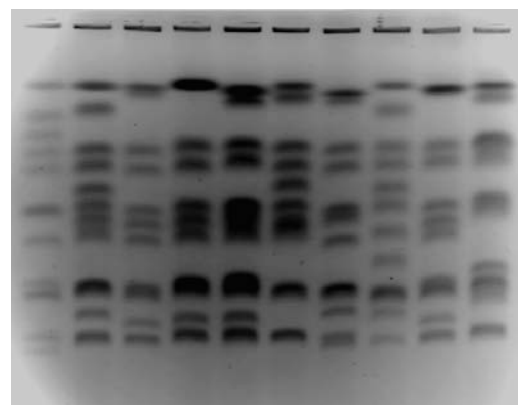
CBS138/1 EU0023 EU0027 EU0034 EU0025 EU0026 EU0033 EU0276 EU0105 EU0102



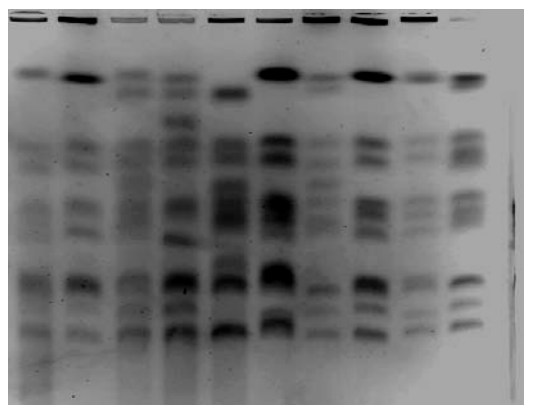
CBS138/1 EU0062 EU0348 EU0018 EU0107 EU0386 EU0089 EU0095 EU0103 EU0381



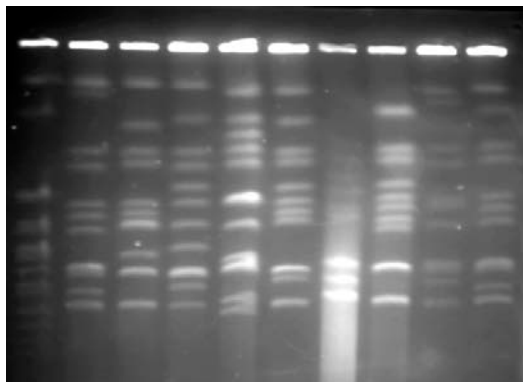
EU0046 EU0483 EU0891 EU0871 EU0161 EU0162 EU0152 EU0045 EU0879 EU0213



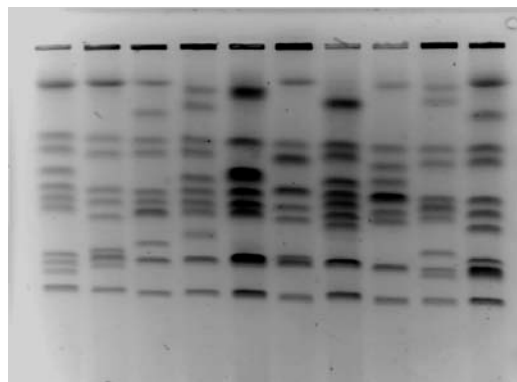
EU0024 EU0024 EU0278 EU0233 EU0357 EU0362 EU0059 EU0884 EU0101 EU0102



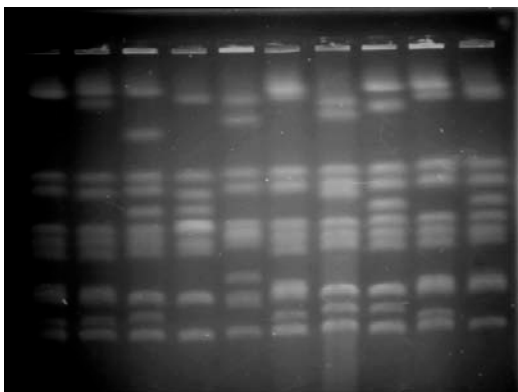
*S. cerevisiae* EU0030 EU0033 EU0045 EU0046 EU0060 EU0058 EU0063 EU0083 EU0086



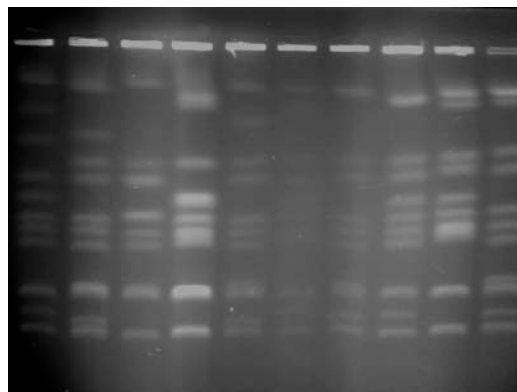
CBS138/1 EU0028 EU0033 EU0044 EU0054 EU0053 EU0063 EU0099 EU0100 EU0181



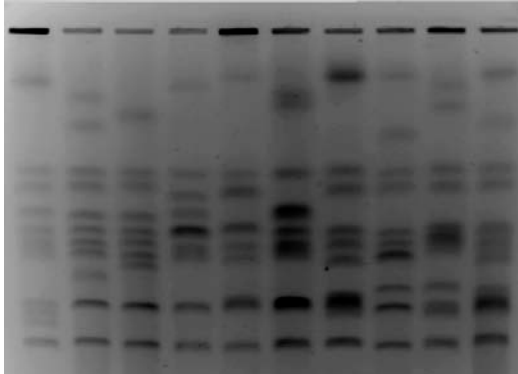
EU0095 EU0096 EU0097 EU0099 EU0100 EU0101 EU0102 EU0103 EU0104 EU0105



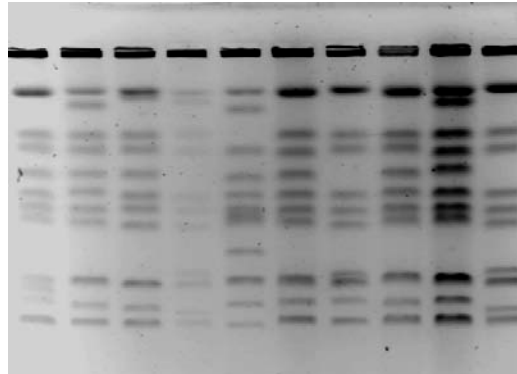
EU0050 EU0052 EU0053 EU0054 EU0057 EU0059 EU0061 EU0062 EU0064 EU0069



CBS138/1 EU0044 EU0063 EU0099 EU0053 EU0054 EU0028 EU0033 EU0100 EU0181



CBS138/1 EU1025 EU1015 EU1011 EU1010 EU1012 EU1013 EU1009 EU1014 EU1016



## 7 Literaturverzeichnis

**Abramova N, Sertil O, Mehta S, Lowry CV** (2001): Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 183, 2881-7

**Aguilar-Uscanga B, Francois JM** (2003): A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37, 268-74

**Ahmad A, Kabir MA, Kravets A, Andaluz E, Larriba G, Rutschenko E** (2008): Chromosome instability and unusual features of some widely used strains of *Candida albicans*. *Yeast* 25, 433-48

**Akins RA** (2005): An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43, 285-318.

**Angiolella L, Stringaro AR, Bernadis FD, Posteraro B, Bonito M, Toccaceli L, Torosantucci A, Colone M, Sanguinetti M, Cassone A, Palamara AT** (2008): Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 927-36

**Arbour M, Epp E, Hogues H, Sellam A, Lacroix C, Rauceo J, Mitchell A, Whiteway M, Nantel A** (2009): Widespread occurrence of chromosomal aneuploidy following the routine production of *Candida albicans* mutants. *FEMS Yeast Res* 9, 1070-77

**Asakura K, Iwaguchi SI, Homma M, Sukai T, Higashide K, Tanaka K** (1991): Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Genet Microbiol* 137, 2531-58

**Bachmann Sp, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, Lopez-Ribot JL** (2002): In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3591-96

**Balashov SV, Park S, Perlin DS** (2006): Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 2058-6

**Barousse MM, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, Fidel PL Jr.** (2004): Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sex Trans Infect* 80, 48-53

**Barousse MM, Espinosa T, Dunlap K, Fidel PL Jr.** (2005): Vaginal epithel cell anti-*Candida albicans* activity is associated with protection against symptomatic vaginal candidiasis. *Infect Immun* 73, 7765-67

**Bendel CM, Hostetter MK** (1991): Correlation of adhesion and pathogenic potential in yeast. *Pediatr Res* 29, 167 A

**Benz F, Knuesel F, Nuesch J, Treichler H, Voser W, Nyfeler R, Keller-Schierlein W** (1974): Echinocandin B, ein neuartiges Polypeptid-Antibioticum aus *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: Isolierung und Bausteine. *Helv Chim Acta* 57, 2458-77

**Bericht des BgVV:** Problematik der Entwicklung von Resistenzen humaner Mykosen gegenüber Azol-Antimykotika und eventueller Wechselwirkungen mit den als Fungizid eingesetzten Pflanzenschutzmitteln. Urban & Vogel Medien und Medizin Verlags GmbH, München 2001

**Borg von Zepelin M, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Groß U** (2007): Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida spp.* to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in germany from july 2004 to august 2005. *J Antimicrob Chemother* 60, 424-28

**Bouchara JP, Zouahir R, Le Boudouil S, Renier G, Filmon R, Chabasse D, Hallet JN, Defontaine A** (2000): In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. J Med Microbiol 49, 977-84

**Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C** (2001): Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 40, 1290-97

**Braun BR, Johnson AD** (2000): TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. Genetics 155, 57-67

**Brisse S, Pannier C, Angoulvant A, De Meeus T, Diancourt L, Faure O, Muller H, Peman J, Viviani AM, Grillot R, Dujon B, Fairhead C, Hennequin C** (2009): Uneven distribution of mating types among genotypes of *Candida glabrata* from clinical samples. Eukaryot Cell 8, 287-95

**Brockert PJ, Lachke SA, Srikantha T, Pujol C, Galask R, Soll DR** (2003): Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. Infect Immun 71, 7109-18.

**Brown JA, Catley BJ** (1992): Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*. Carbohydr Res 227, 195-202

**Brun S, Dalle F, Saulnier P, Renier G, Bonnin A, Chabasse D, Bouchera JP** (2005): Biological consequences of petite mutations in *Candida glabrata*. J Antimicrob Chemother 56, 307-314

**Butler G, Kenny C, Fagan A, Kurischko C, Gaillardin C, Wolfe KH** (2004): Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. Proc Natl Acad Sci 101, 1632-37

**Buffo J, Herman MA, Soll DR** (1984): A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. Mycopathologia 85, 21-30.

**Bulawa CE, Miller DW, Henry LK, Becker JM** (1995): Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA 92, 10570-4

**Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodriguez-Pena JM, Arroyo J** (2007): Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to  $\beta$ (1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Mol Microbiol 63, 921-35

**Cabib E, Farkas V, Kosik O, Blanco N, Arroyo J, Mcphie P** (2008): Crh1p and Crh2p act as transglycosilases *in vivo* and *in vitro*. J Biol Chem 283, 28859-72

**Calcagno AM, Bignell E, Warn P, Jones MD, Denning DW, Muhlschlegel FA, Rogers TR, Haynes K** (2003). *Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. Mol Microbiol 50, 1309-18.

**Calcagno AM, Bignell E, Rogers TR, Canedo M, Muhlschlegel FA, Haynes K** (2004): *Candida glabrata* Ste20 is involved in maintaining cell wall integrity and adaption to hypertonic stress, and is required for wild-type levels of virulence. Yeast 21, 557-68

**Calcagno AM, Bignell E, Rogers TR, Jones MD, Muhlschlegel FA, Haynes K** (2005): *Candida glabrata* Ste11 is involved in adaption to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. Med Mycol 43, 355-64

**Caro LH, Smits GJ, van Egmond P, Chapman JW, Klis FM** (1998): Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. FEMS Microbiol Lett 161, 345-9

**Casadevall A** (2005): Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? Fungal Genet Biol 42, 98-106

**Cateau E, Rodier MH, Imbert C** (2008): In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. J Antimicrobial Chemother 62, 153-55

**Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP** (1998): Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev 62, 130-80

**Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P** (1991): In vitro proteinase production by *Candida spp.*. Mycopathologia 114, 163-8

**Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA** (2001): Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 183, 5385-94

**Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY** (2005): Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol 54, 249-58

**Chen RE, Thorner J** (2007): Function and regulation in MAPK signalling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Acta 1773, 1311-40

**Cormican MG, Hollis RJ, Pfaller MA** (1996): DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida (Torulopsis) glabrata*. Diagn Microbiol Infect Dis 25, 83-87

**Cornely OA, Schmitz K, Aisenbrey S** (2002): The first echinocandin: caspofungin. Mycoses 45, 56-60

**Cota JM, Grabinski JL, Talbert RL, Burgess DS, Rogers PD, Edlind TD, Wiederhold NP** (2008): Increases in SLT2 expression and chitin content are associated with incomplete killing of *Candida glabrata* by caspofungin. Antimicrob Agents Chemother 52, 1144-46



**Csank C, Haynes K** (2000): *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. FEMS Microbiol Lett 189, 115-20

**de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM** (2004): Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. Eukaryot Cell 3, 955-65

**de Groot PW, Ram AF, Klis FM** (2005): Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. Fungal Genet Biol 42, 657-75

**de Groot PWJ, Kraneveld EA, Yin YQ, Dekker HL, Groß U, Crielaard W, de Koster CG, Bader O, Klis FM, Weig M** (2008): The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesion-like wall proteins. Eukaryot Cell 7, 1951-64

**de Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T, van den Ende H** (1990): The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 6, 491-9

**de Nobel JG, Klis FM, Ram A, Van Unen H, Priem J, Munnik T, Van Den Ende H** (1991): Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7, 589-98

**Diezmann S, Cox CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG** (2004): Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. J Clin Microbiol 42, 5624-35

**Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ** (2003): Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J Clin Microbiol 41, 5709-17

**Dodgson AR, Dodgson KJ, Pujol C, Pfaller MA, Soll DR** (2004): Clade-specific Flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2223-27

**Dodgson AR, Pujol C, Pfaller MA, Denning DW, Soll DR** (2005): Evidence for recombination in *Candida glabrata*. *Fungal Genet Biol* 42, 233-43

**Doi M, Homma M, Chindaporn A, Tanaka K** (1992): Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J Genet Microbiol* 138, 2243-51

**Douglas LJ** (2003): *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11, 30-6

**Edlind TD, Henry KW, Vermitsky JP, Edlind MP, Raj S, Katiyar SK** (2005): Promotor-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. *Curr Genet* 48, 117-25

**Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG** (2002): The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci* 99, 7687-92

**Espinel-Ingroff A** (2008): Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 25, 101-106

**Fabre E, Muller H, Therizols P, Lafontaine I, Dujon B, Fairhead C** (2005): Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: Evolution of sex, silencing and subtelomers. *Mol Biol Evol* 22, 856-73

**Fidel PL JR., Vazquez JA, Sobel JD** (1999): *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12, 80-96

**Fischer G, Rocha EP, Brunet F, Vergassolla M, Dujon B** (2006): Highly variable rates of genome rearrangements between hemiascomycetous yeast lineages. *PLoS Genet* 2, 253-61

**Fleet GH** (1985): Composition and structure of yeast cell walls. *Curr Top Med Mycol* 1, 24-56

**Fridkin SK, Jarvis WR** (1996): Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9, 499-511

**Frieman MB, McCaffery JM, Cormack BP** (2002): Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* 46, 479-92

**Garcia-Rodriguez LJ, Trilla JA, Castro C, Valdivieso MH, Duran A, Roncero C** (2000): Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the fks1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 478, 84-8

**Girmenia C, Martino P** (1998). Fluconazole and the changing epidemiology of candidemia. *Clin Infect Dis* 27, 232-4.

**Gow NA, Knox Y, Munro CA, Thompson WD** (2003): Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of *Candida albicans*. *Med Mycol* 41, 331-8

**Granslo H, Gammelsrud KW, Fredheim EA, Flaegstad T, Klingenberg C** (2008): Coagulase-negative *Staphylococci*-biofilm and antibiotic resistance. *Tidsskr Nor Laegeforen* 23, 2746-9

**Gregori C, Schuller C, Roetzer A, Schwarzmuller T, Ammerer G, Kuchler K** (2007): The high-osmolarity glycerol response pathway in the human fungal pathogen *Candida glabrata* strain ATCC 2001 lacks a signalling branch that operates in bakers yeast. *Eukaryot Cell* 6, 1635-45

**Groß, U:** Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006

**Haber JE** (1998): Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Genet 32, 561-99

**Hansen, A:** Bioinformatik. Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler. 2. Auflage, Birkhäuser Verlag, Berlin 2001

**Hazen KC, Plotkin BJ, Klima DM** (1986): Influence of growth on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Infect Immun 54, 269-71

**Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R et al.** (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res 111, 509-47

**Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW** (1993): Fluconazol Resistance in *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother 37, 1962-65

**Hof H:** Mykologie für Mediziner. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003

**Holmes S** (2003): Bootstrapping phylogenetic trees: Theory and methods. Stat Sci 2, 241-55

**Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM** (2009): Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: Data from a prospective antifungal alliance registry. Clin Inf Dis 48, 1695-703

**Hostetter MK** (1994): Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 7, 29-42

**Hoyer LL** (2001): The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9, 176-80

**Hoyer LL, Hecht JE** (2001): The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. Yeast 18, 49-60

**Hube B** (2004): From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol 7, 336-41

**Ikonomidis A, Vasdeki A, Kristo I, Maniatis AN, Tsakris A, Malizos KN, Pournaras S** (2009): Association of biofilm formation and methicillin-resistance accessory gene regulator (agr) loci in greek *Staphylococcus aureus* clones. Microb Pathog 47, 341-4

**Iraqi I, Garcia-Sanchez S, Aubert S, Dromer F, Ghigo JM, d'Enfert C, Janbon G** (2005). The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. Mol Microbiol 55, 1259-71.

**Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E, Klis FM** (1997): Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. J Bacteriol 179, 6279-84

**Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM** (2000): The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. Mol Microbiol 35, 601-11

**Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP** (2005): A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. Curr Opin Microbiol 8, 378-84

**Kaur R, Ma Biao, Cormack BP** (2007): A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. 104, 7628-33

**Klis FM** (1994): Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10, 851-69

**Klis FM, de Groot PWJ, Hellingwerf K** (2001): Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 1-8

**Klis FM, Boorsma A, de Groot** (2006): Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202

**Klotz, Drutz D, Harrison JL, Huppert M** (1983): Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infect Immun* 42, 374-84

**Klotz SA, Drutz D, Zajic JE** (1985): Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* 50, 204-05

**Lachke SA, Joly S, Daniels K, Soll DR** (2002): Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* 148, 2661-74

**Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP** (2001): Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* 276, 1850-56

**Lee I, Fishman NO, Zaoutis TE, Morales KH, Weiner MG, Synnesvedt M, Nachamkin I, Lautenbach E** (2009): Risk factors for fluconazole-resistant *Candida glabrata* Infections. *Arch Intern Med* 169, 379-83

**Lee KL, Buckley HR, Campbell CC** (1975): An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 13, 148-53

**Levin DE** (2005): Cell wall integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317-43

**Li RK, Rinaldi MG** (1999): In vitro antifungal activity of nikkomycin z in combination with fluconazole or itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1401-05

**Lin CY, Chen YC, Lo HJ, Chen KW, Li SY** (2007): Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 45, 2452-59

**Lipperheide V, Bikandi J, Garcia-Fernandez JF, Quindos G, Ponton J** (2002): Colony variation in *Candida glabrata* isolates from patients with vaginitis. *Rev Iberoam Micol* 19, 161-64

**Liu GY, Nizet V** (2009): Colour me bad: microbial pigment as virulence factors. *Trends Microbiol* 17, 406-13

**Lo H J, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR** (1997): Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-49

**Madigan, MT und Martinko, JM**: Brock biology of microorganisms, 11th edition; Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey 2006

**Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG** (1998): Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 95, 3140-45

**Marichal P, Vanden Bossche H, Odds F, Nobels G, Warnock DW, Timmerman V, Van Broeckerhoven C, Fay S, Mose-Larsen P** (1997): Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2229-37

**Mayser P, Wenzel M, Krämer HJ, Kindler BLJ, Spiteller P, Haase G** (2007): Production of indole Pigments by *Candida glabrata*. *Med Mycol* 45, 519-24

**Morschhäuser J** (2003): Resistenzen und Resistenzmechanismen. *Pharm Unserer Zeit* 2, 124-28

**Mühlhardt C**: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 4. Auflage; Elsevier GmbH, München, 2003

**Muller FM, Weig M, Peter J, Walsh TJ** (2000). Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 46, 338-40

**Muller H, Thierry A, Coppee JY, Gouyette C, Hennequin C, Sismeiro O, Talla E, Dujon B, Fairhead C** (2009): Genomic polymorphism in the population of *Candida glabrata*: gene copy-number variation and chromosomal translocations. *Fungal Genet Biol*, 46, 264-76

**Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P**(2006): *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol* 55, 1323-7

**Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA** (2008): An integrated model of recognition of *candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6, 67-78

**Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D** (2007):  $\beta$ -1,3-Glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis* 195, 1705-12

**Niimi K, Maki K, Ikeda F, Holmes AR, Lamping E, Niimi M, Monk BC, Cannon RD** (2006): Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1148-55



**Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, Dix S, Williams J, Gilmore C, Geller R, Wingard JR** (1996) Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin b-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 196-99

**Odds FC**: *Candida and Candidosis*. 2. Auflage; Bailliere and Tindall, London 1988

**Odds FC** (1994): Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 31, S2-5.

**Odds FC, Brown AJ, Gow NA** (2003): Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11, 272-9

**Pardini G, de Groot PWJ, Coste AT, Karababa M, Klis FM, de Koster CG, Sanglard D** (2006): The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281, 40399-40411

**Pfaller MA, Diekema DJ** (2007): Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20, 133-63

**Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN** (2003a): 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. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1068-71

**Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ** (2003b): Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol* 41, 5729-31.

- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ** (2004): Cross-resistance between fluconazol and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida spp.*. J Clin Microbiol 42, 3137-41
- Pfaller MA, Diekma DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Knapp CC, Sheehan DJ, Walsh TJ** (2008): Correlation of MIC with outcome for *Candida* Species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretative MIC breakpoints. J Clin Microbiol 46, 2620-29
- Polakova S, Blume C, Zarate JA., Mentel M, Jorck-Ramberg D, Stenderup J, Piskur J** (2009): Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. Proc Natl Acad Sci 106, 2688-93
- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M** (1997): Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1 $\Delta$  mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 179, 463-9
- Pujol C, Pfaller MA, Soll DR** (2004): Flucytosine resistance is restricted to a singel genetic clade of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 48, 262-66
- Ramsey H, Morrow B, Soll DR** (1994): An increase in switching frequency correlates with an increase in recombination of the ribosomal chromosomes of *Candida albicans* strain 3153A. Microbiology 140, 1525-31
- Ringdahl EN** (2000): Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am Fam Physician 42, 3306-12
- Rodriguez-Pena JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C** (2000): A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. Mol Cell Biol 20,3245-55

**Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R** (2006): Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 6, 14-29

**Rustchenko-Bulgac EP** (1991): Variation of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes. *J Bacteriol* 173, 6586-96

**Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB** (1990): Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 172, 1276-83

**Saitou N, Nei M** (1987): The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-25

**Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J** (1995): Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2378-86

**Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk, Bille J** (1999): The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2753-65

**Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Krapf G, Enzinger S, Presterl E, Kuchler K** (2003): The *Candida albicans* Cdr2 ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* 48, 225-35

**Schwarz Müller T**: Drug resistance and virulence in the human fungal pathogen *Candida glabrata*. Med. Diss. Wien 2009

**Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A, Berman J** (2008): An isochromosome confers drug resistance *in vivo* by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol Microbiol* 68, 624-41

**Selvaggini S, Munro CA, Paschoud S, Sanglard D, Gow NAR** (2004): Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 921-28

**Shin JH, Chae MJ, Song JW, Jung SI, Cho D, Kee SJ Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW** (2007): Changes in karyotyp and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin Microbiol* 45, 2385-91

**Slutsky B, Buffo J, Soll DR** (1985): High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230, 666-9

**Soll D, Langtimm CJ, Mcdowell J, Hicks J, Galask R** (1987): High frequency switching in *Candida* strains isolated of vaginitis patients. *J Clin Microbiol* 25, 1611-22

**Spratt BG** (1999): Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 2, 312-16

**Srikantha T, Lachke SA, Soll DR** (2003): Three mating type-like loci in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 2, 328-40

**Srikantha T, Zhao R, Daniels K, Radke J, Soll DR** (2005): Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryot Cell* 4, 1434-45

**Sugita T, Nishikawa A** (2004): Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 45, 55-8

**Sundstrom P** (2002): Adhesion in *Candida spp.* *Cell Microbiol* 4, 461-69

**Thevelin JM, de Winde JH** (1999): Novel mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 33, 904-18

**Tietz HJ, Sterry W**: Antimykotika von A-Z. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004

**Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de gaetano Donati, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M** (2007): Biofilm production by candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol 45, 1843-50

**Ubeda JM, Legare D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B, Ouelette M** (Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. Genome Biol 9, R115

**Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC, Le Jeune L, Coene MC** (1992): Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob Agents Chemother 36, 2602-10

**Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D** (1998): Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. Med Mycol 36 Suppl 1,119-28

**Vargas KG, Srikantha R, Holke A, Sifri T, Morris R, Joly S** (2004): *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness. Med Sci Monit 10, 198-206

**Wada S, Tanabe K, Yamazaki A, Niimi M, Uehara Y, Niimi K, Lamping E, Cannon RD, Monk BC** (2005): Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability. J Biol Chem 280, 94-103

**Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, Mckinnon A, Gow, NA** (2008): Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* 4, e1000040

**Weig M, Jansch L, Gross U, De Koster CG, Klis FM, De Groot, PWJ** (2004): Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology* 151, 3129-44

**Wheeler RT, Fink GR** (2006): A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* 2, e35

**White TC, Marr KA, Bowden RA** (1998): Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11, 382-402

**Wong S, Fares MA, Zimmermann W, Butler g, Wolfe KH** (2003): Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol* 4, R10

**Wright CD, Herron MJ, Gray GR, Holmes B, Nelson RD** (1981): Influence of yeast mannan on human neutrophil functions inhibition of release of myeloperoxidase related to carbohydrate binding property of the enzyme. *Infect Immun* 32, 731-8

**Yano J, Lilly EA, Steele C, Fortenberry D, Fidel PL Jr.** (2005): Oral and vaginal epithelial cell anti-*Candida* activity is acid labile and does not require live epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 20, 199-205

**Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E** (1984): *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol* 159, 1018-26

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen anfertigen durfte. Großer Dank gilt insbesondere meinen Betreuern Herrn PD Dr. med. Michael Weig und Herrn Dr. rer. nat. Oliver Bader für die Überlassung des interessanten Themas und die wertvolle Unterstützung während meiner Arbeit. Die stete Ansprechbarkeit, die konstruktiven Anregungen, sowie die zügige und kritische Durchsicht und Korrektur meiner Manuskripte haben einen Großteil zum Gelingen des Projekts beigetragen.

Besonderer Dank gebührt ebenfalls Frau Dr. Mette Jacobson und Frau Kathy Lee aus der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Frank Odds der University of Aberdeen für die Durchführung der Multilokus-Sequenztypisierung. Des Weiteren danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Instituts, vor allem aber der Ag Weig, für das angenehme und motivierende Arbeitsklima und die vielen praktischen Tipps für den Laboralltag und das Zusammenschreiben.

Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Freundin Kristin und Frau Dr. rer. nat. Maram Bader für die unschätzbare Unterstützung bei der grafischen Gestaltung, der Formatierung und die wiederholte Durchsicht meiner Arbeit, sowie die konstruktive Kritik bedanken.