

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(ehemaliger Direktor: Prof. Dr. H. Hepp,
jetziger Direktor: Prof. Dr. K. Friese)

***In vivo*-Expressionsnachweis sekretorischer Aspartylproteinasen von
Candida albicans bei Patientinnen mit einer akuten Vaginalkandidose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Korkut Avşar

aus
München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Dr.med.habil. E.R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Privatdozent Dr. A. Roggenkamp
Prof. Dr. B. Gerber
Prof. Dr. E. Fink

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.hum.biol. Vera Tolbert

Dekan: Prof. Dr.med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Allgemeines zur gynäkologischen Mykologie.....	4
1.2	Vulvovaginalkandidose.....	5
1.2.1	Häufigkeit.....	5
1.2.2	Klinisches Bild.....	6
1.2.3	Prädisponierende Faktoren.....	7
1.3	<i>Candida albicans</i>	8
1.3.1	Aufbau.....	8
1.3.2	Morphologie.....	8
1.4	Adhäsion	11
1.5	Sekretorische Aspartylproteinasen (SAPs)	11
1.5.1	Allgemeines.....	11
1.5.2	Zielproteine der SAPs	13
1.5.3	Regulation	14
1.5.4	SAP-Expression <i>in vitro</i>	15
1.5.5	SAP-Expression während Schleimhautinfektionen.....	15
1.5.6	Rolle der SAPs bei systemischen Infektionen	16
1.5.7	Einfluss des Wirt-Immunsystems auf die SAP-Expression	17
1.6.8	Die SAP-Familie als potentieller therapeutischer Angriffspunkt	17
1.6	Aufgabenstellung dieser Arbeit	18
2	Methode	20
2.1	Probenentnahme und Aufbewahrung.....	20
2.1.1	Entnahmeorte	20
2.1.2	Entnahmetechnik.....	20
2.1.3	Aufbewahrung.....	21
2.2	Mikrobiologische Methoden	21
2.3	Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1	RNA-Isolierung.....	22
2.3.2	DNA-Verdau	23
2.3.3	Reverse Transkription	23
2.3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	24

2.3.5	Gel-Elektrophorese	27
2.3.6	Kontrollmechanismen	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Patientengut.....	30
3.1.1	Gruppe der symptomatischen Patientinnen.....	30
3.1.2	Gruppe der asymptomatischen Patientinnen.....	30
3.2	Kultureller Nachweis	31
3.3	Proteinasennachweis	32
3.3.1	Spezifität und Sensitivität der Methode	32
3.3.2	Symptomatische Patientengruppe	33
3.3.3	Asymptomatische Patientengruppe (Kontrollgruppen)	42
3.3.4	Vergleich Schwangere versus Nicht-Schwangere	46
3.4	Statistische Auswertung.....	47
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung	55
6	Literaturverzeichnis	57
7	Anhang	66
7.1	Material und Bezugsquellen.....	66
7.1.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	66
7.1.2	Enzyme.....	66
7.1.3	Lösungen, Puffer und Kulturmedien.....	67
7.1.4	Molekularbiologische Hilfsmittel	67
7.1.5	DNA-Längenstandard	67
7.2	Technische Geräte.....	67
7.3	Gensequenzen	69
7.4	Gesamtheit der bearbeiteten Proben	78
8	Danksagung	82
9	Lebenslauf	93

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zur gynäkologischen Mykologie

In der medizinischen Mykologie spielen Infektionen mit Hefepilzen eine bedeutende Rolle. Hier sind es insbesondere die für Haut-, Schleimhaut- und systemische Infektionen verantwortlichen Vertreter der Gattung *Candida*. Die am häufigsten bei Kandidose-Patienten isolierte Art ist *Candida albicans* (Odds, 1988). Mehr als 70% aller Infektionen durch Hefen gehen auf *C. albicans* zurück (Koenig, 1989). *Candida*-Infektionen sind ein ernstes medizinisches Problem, das durch die Zunahme an immunkompromitierten Patienten ein Krankheitsbild mit zunehmender Inzidenz darstellt. Das Patientenkollektiv setzt sich schwerpunktmäßig aus HIV-positiven, neutropenischen, immunsupprimierten und brandverletzten Patienten sowie aus frühgeborenen Neonaten zusammen. Insbesondere Patienten mit Tumorerkrankungen oder Hämoblastosen sind von invasiven Mykosen betroffen. Hier prädisponiert die therapie- oder erkrankungsbedingte Granulozytopenie für die Infektion.

Gerade systemische Infektionen sind mit einer hohen Mortalität belastet. Ohne Behandlung versterben über 68% der Patienten mit disseminierter *Candida*-Sepsis, bei adäquater Behandlung sind es immer noch über 34% der Patienten, die der Infektion erliegen (Macphail, 2002). Neben *Candida spp.* sind auch *Aspergillus spp.* bei Systemmykosen nachzuweisen. Zwar treten im Rahmen von nosokomialen Infektionen invasive Mykosen im Vergleich zu bakteriellen Infektionen seltener auf, die erregerassoziierte Mortalität ist allerdings besonders in der Phase der schweren Granulozytopenie deutlich höher und kann bis zu 100% betragen. Insgesamt zeigen die jüngsten Daten des amerikanischen Centers of Disease Control nicht nur eine numerische Zunahme von Pilzinfektionen, sondern auch einen Anstieg der Mortalität (McNeil, 2001).

Die Kandidose beschränkt sich aber keinesfalls auf Immungeschwächte, sondern ist gerade im gynäkologisch-geburtshilflichen Bereich eine weitverbreitete Erkrankung. Was den Kommensalen, also normalerweise harmlosen Besiedler, zu einem opportunistischen Krankheitserreger macht, ist Gegenstand intensiver Diskussionen. Dabei ist neben den für die Infektion wegbereitenden Faktoren von Seiten der Patienten die Virulenz des Pilzes von entscheidender Bedeutung. In der gynäkologischen Praxis sind die Erreger von Mykosen fast immer fakultativ pathogene Hefepilze der Gattung *Candida*. Die für die

Gynäkologie und Geburtshilfe bedeutendste *Candida*-Art ist *C. albicans*, die in 80-90% der Fälle isoliert werden kann. *Candida glabrata* ist der zweithäufigste Vertreter und für 5-15% der Vaginalkandidosen verantwortlich. Ebenfalls für die Vagina als fakultativ pathogen anzusehen sind *Candida tropicalis* (ca. 5% der Fälle), *Candida kefyr* (früher: *Candida pseudotropicalis*) und *Candida krusei*. Weitere Arten wie *Candida parapsilosis* und *Candida guilliermondi* werden selten gefunden (Grillot, 1996; Spinillo, 1995; Moyal, 1996)

In den letzten Jahren lassen sich Bewegungen in der Verteilung verzeichnen. So läßt sich ein signifikanter Anstieg der Nicht-*albicans*-Arten, insbesondere *C. glabrata* und *C. tropicalis*, beobachten (Spinillo, 1994). Diese Entwicklung zeigt sich besonders bei rezidivierenden Verläufen. 20-30% der rezidivierenden Vulvovaginalkandidosen werden durch diese beiden Erreger verursacht, wobei *C. glabrata* der weitaus häufigere ist (Nyirjesy, 1995; Spinillo, 1993). Dass zunehmend Nicht-*albicans*-Arten isoliert werden hat seine Ursache wohl in der weitverbreiteten, inadäquaten Anwendung von Antimykotika (Selbstmedikation, Langzeitanwendungen). Da Nicht-*albicans*-Arten teilweise gegen die üblichen Antimykotika resistent sind, kommt es unter dem Selektionsdruck der Therapie zu einer Veränderung der Besiedelung (Fidel, 1999). *C. albicans* nimmt dabei in seiner Häufigkeit ab während die anderen *Candida*-Arten zunehmen.

1.2 Vulvovaginalkandidose

1.2.1 Häufigkeit

Candida albicans ist ein Schleimhautkommensale, der in der Mundhöhle, im Magen-Darm-Trakt und in der Vagina gefunden wird ohne Krankheitszeichen zu verursachen. Hier lebt der Pilz im Gleichgewicht mit der restlichen residenten mikrobiologischen Flora und dem Immunsystem des Wirtes. Man schätzt, dass 20% aller gesunden, symptomfreien Frauen während ihrer praemenopausalen Jahre mit *C. albicans* besiedelt sind. Diese Zahl erfährt nach der Menopause einen drastischen Rückgang. Durch geringe Störungen dieses Gleichgewichtes kann der Kommensale ein pathologisches Potential erlangen.

Nahezu dreiviertel aller gesunden Frauen erkranken mindestens einmal in Ihrem Leben an einer symptomatischen Genitalkandidose (Sobel, 1985). Etwa die Hälfte dieser

erkrankten Frauen wird ein zweites Mal erkranken (Hurley, 1979). Annäherungsweise 5% der Fälle wird in eine rezidivierende Vulvovaginalkandidose übergehen (Hurley, 1981). Vaginaler Ausfluss und Juckreiz im Bereich der Vulva und des Introitus Vaginae gehen zu über 70% auf *Candida*-Infektion zurück, in ca. 85% der Fälle ist *C. albicans* der Artvertreter (Linhares, 2001). *C. albicans* ist weltweit die Hauptursache für Kolpitiden. Lediglich in den Vereinigten Staaten ist die bakterielle Vaginitis geringfügig häufiger als die Kandidose (Sobel, 1993).

Besondere epidemiologische Bedingungen herrschen in der Schwangerschaft vor. Hier lässt sich *C. albicans* bei 30-40% der Frauen isolieren, die höchste Virulenz scheint der Erreger im letzten Trimenon zu haben (Odds, 1988).

1.2.2 Klinisches Bild

Die Vaginalkandidose der Frau tritt fast nur im hormonaktiven Alter auf. Die klinischen Symptome einer Vulvovaginalmykose sind nicht einheitlich. Die Patientinnen klagen meist über Juckreiz im Introitusbereich. Meist beginnt der Juckreiz prämenstruell. Die in dieser Arbeit verwendete Einteilung nimmt Bezug auf stattgehabte Therapien und die Häufigkeit der Erkrankungen (Weissenbacher, 1998); die gleichen Einteilungen existieren auch für die Vulvakandidose und die Kombination, die Vulvovaginalkandidose:

- Akute Vaginalkandidose
Von einer akuten Kandidose spricht man, wenn die Frauen aus Beschwerdefreiheit heraus akut erkranken.
- Chronische Vaginalkandidose
Sind mehr als vier Infektionen im letzten Kalenderjahr zu verzeichnen gewesen, spricht man von einer chronischen Kandidose.
- Persistierende Vaginalkandidose
Trotz antimykotischer Therapie persistieren die verursachenden Sprosszellen und die klinischen Erscheinungen. Meist sind dauerhaft prädisponierende Faktoren vorhanden, die das Persistieren der Infektion verursachen.
- Rezidivierende Vaginalkandidose
Nach antimykotischer Therapie einer Vaginalmykose mit Hefepilz- und Beschwerdefreiheit kommt es bei der Patientin nach 4-12 Wochen zu einem Rückfall.
- Chronisch rezidivierende Vaginalkandidose
Nach antimykotischer Behandlung treten mindestens vier Rezidive pro Jahr auf.

1.2.3 Prädisponierende Faktoren

1.2.3.1 Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft ist die Empfänglichkeit für vaginale Infektionen erhöht. Hohe Östrogenspiegel sorgen für ein glykogenreiches Vaginalepithel, welches wiederum rückwirkend die Nahrungsgrundlage für das *Candida*-Wachstum bildet (Bohbot, 1995). Desweiteren begünstigt der physiologische Hyperöstrogenismus die Adhäsion und Vermehrung der *Candida*-Zellen.

1.2.3.2 Kontrazeption

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Frauen, die hormonelle Kontrazeptiva einnehmen, vermehrt mit *Candida*-Arten kolonisiert sind. Diese Beobachtung gilt insbesondere bei Kontrazeptiva mit hohem Östrogenanteil (Denning, 1995). Der Mechanismus beruht also, mit der Schwangerschaft vergleichbar, ebenfalls auf dem Hyperöstrogenismus (siehe 1.2.3.1). Für hormonelle Kontrazeptiva mit geringem Östrogenanteil konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Entstehen einer Vulvovaginalkandidose hergestellt werden (Foxman, 1990; Geiger, 1996).

Die Kontrazeption mittels eines Intrauterinpessars kann der Grund für eine rezidivierende Kandidose sein, da der zur Entfernung des Pessars in der Scheide verbleibende Faden als Reservoir für *Candida*-Zellen dienen kann (Bohbot, 1995).

1.2.3.3 Diabetes mellitus

Diabetische Frauen zeigen gegenüber der Normalbevölkerung eine höhere Prävalenz für Kandidosen. Stoffwechsellentgleisungen prädisponieren für Vulvovaginalkandidosen (Reed, 1992). Dieser Faktor kann selbstverständlich durch konsequente Einstellung des Blutzuckerspiegels minimiert werden. Typ-I-Diabetikerinnen sind etwa dreimal so häufig betroffen wie Typ-II-Diabetikerinnen. Eine schlechte Blutzuckereinstellung erhöht das Risiko für Kolonisation bzw. eine symptomatische Infektion (de Leon, 2002).

1.2.3.4 *Therapie mit Antibiotika*

Nach systemischer oder lokal in der Vagina applizierter Antibiotikatherapie kommt es häufig zu einer symptomatischen Kandidose (Bluestein, 1991). Antibiotika reduzieren die Zahl der Laktobazillen in der Scheide, so dass den *Candida*-Organismen die Adhäsion erleichtert wird und mehr Nahrung und Raum zur Verfügung steht.

1.2.3.5 *Sexualverhalten*

Das Sexualverhalten ist mit vielen Genitalinfektionen assoziiert, der Einfluß der Sexualpraktiken auf die Vulvovaginal-Kandidose konnte allerdings bisher nicht eindeutig umrissen werden. Stattgehabter Oralsex (Cunnilingus) stellt aber einen gesicherten Risikofaktor dar (Reed, 2000).

1.3 *Candida albicans*

1.3.1 *Aufbau*

Als einzelliger Eukaryont besitzt *C. albicans* zelluläre Basisstrukturen wie Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Ribosomen sowie verschiedene Granula und Vakuolen. Die Zellmembran besteht aus einer doppelten Phospholipidschicht, darüber befindet sich die Zellwand, die vorwiegend Polysaccharide und Proteine enthält. Ein weiterer Bestandteil der Zellwand ist Chitin (etwa 0,6-9%). Eine Besonderheit der pilzlichen Zellwand stellt das Vorhandensein von Ergosterin dar. Dies hat therapeutische Bedeutung, da dieses Sterin der Angriffspunkt vieler Antimykotika ist, wie z. B. der Polyene und der Azole. Durch Eingriff in den Ergosterinstoffwechsel kommt es zu Veränderungen in der Permeabilität der Zellwand und schließlich zum Absterben der Hefezelle.

1.3.2 *Morphologie*

In Abhängigkeit von Umweltbedingungen können Hefen eine Reihe verschiedener Zustandsformen annehmen (siehe Abbildung 1):

- Hefeform (Blastosporen)
- Hyphenform
- Chlamydosporen (große, runde, in der Mikroskopie stark lichtbrechende Sporen, die durch Zellwandverdickung endständig am Pseudomyzel entstehen)

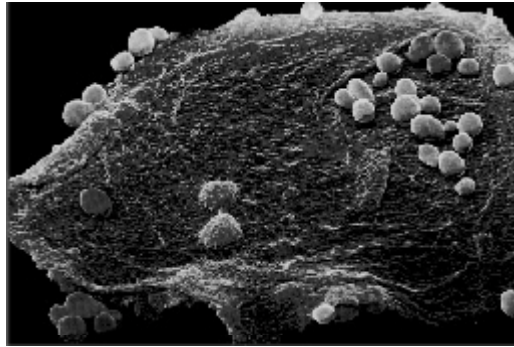


Abbildung 1a: Blastosporen von *Candida albicans* auf einer Epithelzelle (<http://www.tauruspharma.de/pub/candida.htm>).

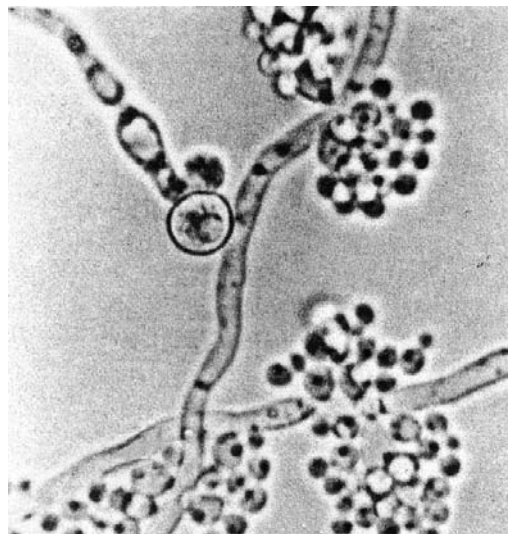


Abbildung 1b: Blastosporen, Hyphen und Pseudohyphen von *Candida albicans* (Manual of clinical microbiology, 5th ed., A. Balows et al.).

In der Hefeform (*Blastospore*) ist *C. albicans* ein 3 bis 5 μm großer Organismus. Die Reproduktion erfolgt durch Knospung. *Blastosporen* sind nicht in der Lage, in epitheliale Gewebe vorzudringen und eine Kolpitis auszulösen (Fidel, 1996). Bei Veränderung der Umweltbedingungen (z. B. Temperaturanstieg, Verschiebungen des pH-Werts) kann *C.*

albicans in ein Hyphenwachstum übergehen. Die Hyphenform wirkt sich begünstigend auf das Fortschreiten einer Infektion aus, da *Hyphen* die Tendenz haben, sich entlang vorgegebener Strukturen wie z. B. Zellgrenzen auszubreiten. Man geht davon aus, dass die *Blastosporen* die morphologische Zellform bei asymptomatischer Vaginalbesiedelung ist. Die Pseudohyphenformation scheint die gewebsinvasive Form zu sein.

Als Beispiel für die Bedeutung des dimorphen Verhaltens für den Infektionsprozess sei folgende Beobachtung angeführt: Es ist eine klinische Erfahrung, dass vaginale Kandidosen selten mit bakteriellen Vaginosen vergesellschaftet sind. Bakterielle Vaginosen zeichnen sich dadurch aus, dass die Döderlein-Flora durch fakultative und strikte Anaerobier ersetzt wird, die volatile Amine produzieren. Die Amine sind für den charakteristischen Geruch verantwortlich. Dies ließ vermuten, dass bakterielle Amine die Keimschlauchbildung hemmen könnten. Daraufhin wurden Cadaverin und Putrescin getestet (diese werden hauptsächlich von *Gardnerella vaginalis* gebildet), wobei sich eine dosisabhängige Hemmung der Hyphenbildung bei *C. albicans* zeigte. Die Amine hemmten ebenfalls die Teilung der Hefezellen (Rodrigues, 1999).

Die reine Kolonisation lässt sich mykologisch von der *Candida*-Vaginitis unterscheiden (Ferrer, 2000):

Tabelle 1: Mykologische Unterschiede zwischen den klinischen Ausprägungen Kolonisation und Vaginitis.

	Vorwiegende Morphologie	Proteolyse
Kolonisation	Hefeform	+ / ++
Vaginitis	Hyphenform	+++ / ++++

Die Fähigkeit zum Morphologiewechsel wurde schon lange mit der Virulenz von Pilzen in Verbindung gebracht (*fungus morph*). Durch eine hohe genetische Flexibilität, die sich in Veränderungen des Phänotyps äußert, kann sich *C. albicans* an verschiedene Wirtsnischen anpassen. Dieses sog. "*phenotypic switching*" geschieht spontan und tritt mit einer hohen Frequenz auf. Es steht in engem Zusammenhang mit dem sogenannten *Thigmotropismus*, der die Tendenz der Hyphen beschreibt, entlang vorgegebener Strukturen wie Zellgrenzen oder mikroskopisch kleinen Diskontinuitäten des Epithels zu wachsen.

1.4 Adhäsion

Die Adhäsion, also das Anhaften an Schleimhautoberflächen, ist für das Überleben der *Blastosporen* entscheidend. Im Vergleich zu *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* und *C. krusei* ist die Fähigkeit zur Adhäsion bei *C. albicans* am stärksten ausgeprägt und erklärt das gehäufte Vorkommen von *C. albicans* in klinischen Proben (King, 1980). Organismen der Gattung *Candida* sind in der Lage, an spezifische Rezeptoren oder an der Zelloberfläche vorhandenes Phospholipid oder Fibronectin von Vaginalepithelzellen zu binden (Krivan, 1989; Bohbot, 1996). Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass die Adhärenz von *Candida*-Arten individuellen Schwankungen unterliegt (Sobel, 1981). So können die individuellen Unterschiede der Frauen im Bezug auf die Empfänglichkeit für das Entstehen einer Vulvovaginalkandidose auch durch die verschiedenen Ausprägungen der *Blastosporen*-Adhärenz erklärt werden. Die Laktobazillenflora übt ebenfalls Einflussnahme auf die Adhäsion aus. Eine gesunde, dichte Laktobazillenflora schützt durch das Bedecken der Bindungsstellen die Vaginalschleimhaut vor einer Pilzbesiedelung (Sobel, 1981). Eine reduzierte Laktobazillenflora begünstigt also über ein mikrobiologische Ungleichgewicht eine Kandidose.

1.5 Sekretorische Aspartylproteinasen (SAPs)

1.5.1 Allgemeines

Infektionen mit *C. albicans* werden sowohl durch Wirtseinflüsse, wie z. B. durch Immunschwäche des Wirts oder Störungen des mikrobiologischen Gleichgewichtes, als auch durch eine Reihe verschiedener Mechanismen und Faktoren des Pilzes ermöglicht. Wichtige Faktoren sind dabei neben Dimorphismus, Adhäsionsfaktoren und hydrolytischen Enzymen die Proteinase der Sekretorischen Aspartylproteinase-Familie (SAP-Familie), die Mitte der sechziger Jahre entdeckt wurden (Staib, 1965) und von besonderer Bedeutung sind (Hube, 1996). Durch den Begriff "sekretorische Aspartylproteinase" werden bereits zwei wichtige Charakteristika dieser Enzyme beschrieben: einerseits der extrazelluläre Wirkungsbereich und andererseits die Zugehörigkeit zur Klasse der Aspartat-Proteinase.

Insgesamt werden vier verschiedene Proteinase-Klassen unterschieden:

- Serin-Proteinase (z. B. Trypsin, Chymotrypsin)
- Cystein-Proteinase (z. B. Papain)
- Metallo-Proteinase (z. B. Kollagenase)
- Aspartat-Proteinase (z. B. Pepsin, Renin)

Es fällt auf, dass *C. albicans* lediglich Aspartat-Proteinase sezerniert, wohingegen ein anderer humanpathogener Pilz, *Aspergillus fumigatus*, sowohl über Aspartat-, als auch über exkretierte Serin- und Metalloproteinase verfügt. Allerdings konnte bei keinem dieser Enzyme ein direkter Zusammenhang mit der Virulenz von *A. fumigatus* nachgewiesen werden (Monod, 1999).

Inzwischen sind 10 verschiedene *SAP*-Gene bei *C. albicans* bekannt (Hube, 2001), die verschiedenartig reguliert und exprimiert werden. Die Vielfältigkeit der *SAP*-Expression konnte durch experimentelle Infektionen *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Nur die pathogenen *Candida*-Arten, wie *C. albicans* (Magee, 1993), *C. dubliniensis* (Gilfillan, 1998), *C. tropicalis* (Zaugg, 2001), *C. glabrata* (Bader, 2001) und *C. parapsilosis* (Monod, 1994), verfügen über derartige Proteinase, während sie z. B. bei der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* fehlen. Dies lässt vermuten, dass es sich bei diesen Proteinase um wichtige Virulenzfaktoren handeln könnte.

Die kodierenden Sequenzen der Gene haben eine Länge von 1173 bp (*SAP1*) bis 1764 bp (*SAP7*). Alle zehn *SAP*-Gene kodieren für Preproenzyme, die um ca. 60-200 Aminosäuren länger sind als ihre Endprodukte. Im endoplasmatischen Retikulum wird das Signalpeptid von der Signalpeptidase abgespalten. Das entstandene Propeptid verfügt über zwei Lys-Arg-Bereiche, die Zielsubstrat für die Kex2 Proteinase des Golgi-Apparates sind. Obwohl der Kex2 eine Schlüsselrolle in der Prozessierung der *SAP*-Proteinase zugesprochen wird, wird davon ausgegangen, dass innerhalb der Zelle weitere Möglichkeiten der Prozessierung bestehen (Togni, 1996). Auch konnte eine extrazelluläre Autoaktivierung der Proteinase Sap1-3 und Sap6 bei bestimmten pH-Werten nachgewiesen werden (Koelsch, 2000).

Nach der Prozessierung im Golgi-Apparat erfolgt via Vesikel ein Transport an die Zelloberfläche und die Sekretion. Im Gegensatz zu Sap1-8 verfügen Sap9 und Sap10 über die gleiche C-terminale Aminosäuresequenz, die typisch für Membranproteine des Glycosylphosphatidylinositol-Komplexes sind. Diese Beobachtung legt nahe, dass die beiden Proteinase Sap9 und Sap10 in der Zellmembran verankerte Bestandteile der Zellwand sind (Caro, 1997).

Mit Hilfe der Aminosäuresequenzen lassen sich Verwandtschaftsverhältnisse unter den SAP-Isoenzymen bestimmen (Stehr, 2000; siehe Abbildung 2). Die abgeleiteten Proteine der Gene *SAP1-3*, *SAP4-6* und *SAP9-10* zeigen hohe Ähnlichkeiten zueinander auf, wohingegen die Proteinase Sap8 und Sap7 geringere Ähnlichkeiten mit anderen Mitgliedern der Isoenzymfamilie aufweisen. So kann man die Proteinase Sap1-3, Sap4-6 und Sap9-10 in Untergruppen aufteilen:

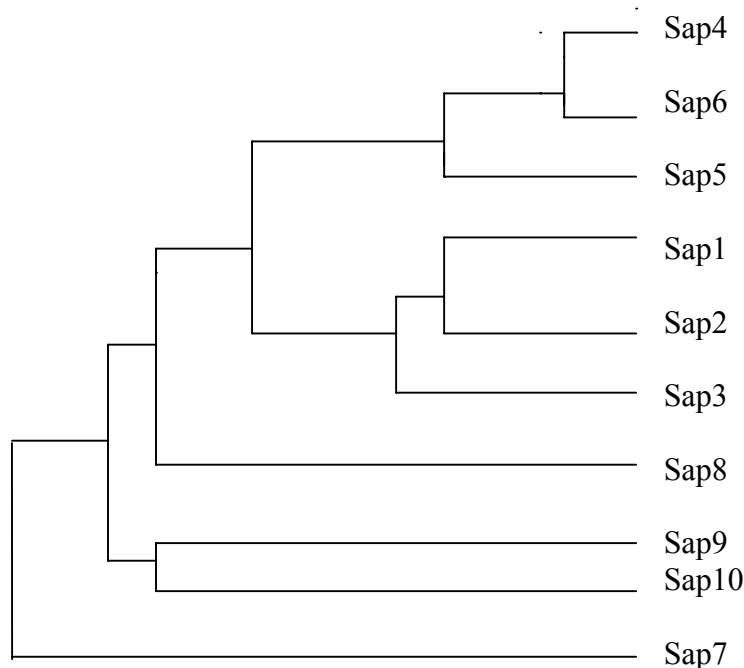


Abbildung 2: Die SAP-Isoenzymfamilie in *C. albicans*.

1.5.2 Zielproteine der SAPs

Eine grundlegende Funktion der *C. albicans* SAPs ist sicher die Bereitstellung von Stickstoff aus Wirtproteinen. Mit Hilfe aufgereinigter *Candida*-Proteinase konnten eine ganze Reihe von potentiellen Zielproteinen ermittelt werden, die zumindest *in vitro* hydrolysiert wurden (Rüchel, 1992). Durch N-terminale Aminosäuresequenzierungen und Expressionsstudien (Hube, 1994; White, 1995) konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse dieser Untersuchung ausschließlich auf die Aktivität eines einzigen Genprodukts, der Sap2-Proteinase, beschränken. *In vitro* war Sap2 in der Lage Proteine der extrazellulären Matrix und Oberflächenproteine abzubauen. Dazu zählten Keratin, Kollagen, Laminin, Fibronectin und Muzin. Sap2 konnte aber auch Proteine der unspezifischen Immunantwort, wie Laktoferrin und den Proteinasehemmer Alpha-Macroglobulin hydro-

lysieren. Auch die meisten Immunglobuline zählen zum Substrat der Sap2, wie z. B. das sekretorische IgA, das normalerweise gegenüber den meisten bakteriellen Proteinase resistent ist (Kaminishi, 1995). Nur für wenige Proteine, so z. B. Lysozym und Ferritin, ist eine Resistenz gegenüber der Sap2-Aktivität beschrieben (Rüchel, 1992).

Die SAP-Aktivität stellt somit für den Pilz nicht nur eine Stickstoffquelle dar, sondern ermöglicht die Anlagerung an Gewebe und die Penetration von anatomischen Schranken. Dies ist z. B. für die Hydrolyse des Muzins im Darm beschrieben. Dieser durch Sap2 vermittelte Schritt ermöglicht *C. albicans* in die gastrointestinale Mukosa vorzudringen (Colina, 1996). Der Abbau von Proteinen der extrazellulären subendothelialen Matrix mag ein Grund für die Invasion des Pilzes in endotheliale Zellschichten sein (Morschhäuser, 1997).

Durch Einsatz des Aspartylproteinasehemmers Pepstatin A konnte eine Penetration von *C. albicans* durch Schleimhautoberflächen verhindert werden (Fallon, 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass HIV-Proteasehemmer (z. B. Indinavir) auch auf SAPs von *C. albicans* wirken. Sie hemmen die Adhärenz von *C. albicans* an epitheliale Oberflächen (Borg-von-Zepelin, 1999). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass SAP-Aktivitäten entscheidend an der Adhärenz von *Candida* an menschliche Mukosa beteiligt sind.

Die sekretorischen Aspartylproteinase von *C. albicans* sind auch in der Lage, in proteolytische Kaskaden ihres Wirtes einzugreifen. Diese Aktivität wirkt im Fall der Blutgerinnungskaskade aktivierend (Kaminishi, 1994) während sie auf das epidermale Cystatin A einen inaktivierenden Einfluss hat (Tsushima, 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die *Candida*-Proteinase in der Lage sind, das proinflammatorische Zytokin Interleukin 1- β aus seiner Vorstufe zu aktivieren. Diese Beobachtung legt den SAPs eine Rolle bei der Aktivierung und Aufrechterhaltung von epidermalen Entzündungsreaktionen nahe (Beausejour, 1998).

1.5.3 Regulation

Alle Mitglieder der SAP-Genfamilie kodieren für Preproenzyme. Hieraus ergibt sich, dass der Pilz über mindestens zwei mögliche Wege verfügt, die Expression zu regulieren: die Regulation auf der Ebene der mRNA oder auf der Proteinebene. Durch Studien zur Sap2-Sekretion mit Hilfe des Protein-Labelings (pulse-chase Experimente) konnte gezeigt werden, dass die Synthese der Proteinase und ihre Sekretion gekoppelt sind, d. h. es zu keiner intrazellulären Akkumulation kommt (Banerjee, 1991; Homma, 1993). Diese

Ergebnisse legen einen Regulationsmechanismus nahe, der vorwiegend auf der Ebene der mRNA stattfinden muss. *SAP2* wird dabei durch einen positiven Feedback Mechanismus gesteuert. Peptide, die bei der Proteolyse großmolekularer Eiweiße entstehen, induzieren die *SAP2*-Expression (Hube, 1994). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der anderen *SAPs* nicht nur unter dem Einfluss exogener Peptide oder Proteine steht. So wird die Expression von *SAP8* durch Temperatureinflüsse reguliert (Monod, 1998), und für *SAP1* und *SAP3* konnte ein Zusammenhang der Expression mit dem Wechsel des Phänotyps gezeigt werden (White, 1993).

1.5.4 *SAP-Expression in vitro*

Die mRNA von *SAP2* scheint das häufigste Transkript von Zellen zu sein, die sich in der log-Phase (Phase des exponentiellen Wachstums) befinden (Hube, 1994; White, 1995). Dagegen steht die Expression der Proteinasegene *SAP1* und *SAP3* in Zusammenhang mit dem "phenotypic switching" der Zelle (Morrow, 1992; Hube, 1994; Morrow, 1994; White, 1995). Die Expression der *SAP*-Gene scheint dabei sich jedoch nicht gegenseitig zu beeinflussen, da *SAP3* Transkripte auch in Zellen nachgewiesen werden konnten, in denen *SAP2* stark exprimiert wurde (Smolenski, 1997; Hube, 1994).

Die Expression von *SAP4-6* konnte in Zellen nachgewiesen werden, die bei neutralem pH-Wert von der Hefen- zur Hyphenform wechselten (Hube, 1994; White, 1995). Chen und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass *Sap4-6* allerdings nicht als eine homogene Gruppe zu betrachten sind: *Sap5* wird in der frühen Phase nach Wechsel zur Hyphenform bei neutralem pH-Wert gebildet, *Sap4* und *Sap6* dagegen erst 24 Stunden nach dem Phänotypenwechsel, wenn die Ansäuerung des Milieus einsetzt. Für *SAP9* konnte eine Zunahme der Expression für spätere Wachstumsphasen gezeigt werden, in denen die Expression der übrigen *SAPs* bereits im Rückgang begriffen war (Monod, 1998).

1.5.5 *SAP-Expression während Schleimhautinfektionen*

Die *SAP*-Expression während Infektionen wurde bislang mit Hilfe von *in vitro*-Modellen und in experimentellen Tierinfektionen aufgeschlüsselt. Modelle für orale (Schaller, 1998) und kutane (Schaller, 2000) Infektionen konnten zeigen, dass *Sap1-3* die hauptsächlich exprimierten Proteinasen während oberflächlicher Infektionen sind. Im oralen

Schleimhautmodell korrelierte die *SAP1*-, *SAP3*- und *SAP6*-Expression mit dem Gewebeschaden. *SAP2*-Expression war in den frühen Infektionsphasen nicht nachweisbar, obwohl diese Proteinase unter *in vitro*-Bedingungen die Dominierende ist.

In einer weiteren Studie waren *SAP2*-, *SAP9*- und *SAP10*-Transkripte zwar in der frühen Infektionsphase (innerhalb 6 Stunden nach Inokulation einer "reconstituted human vaginal epithelium"-Schleimhaut) bereits nachweisbar, eine Gewebeschädigung trat aber erst 12 Stunden nach Inokulation auf, nachdem zusätzlich *SAP1*, *SAP4* und *SAP5* exprimiert waren (Schaller, 2003).

De Bernardis und Mitarbeiter (1999) konnten mit Hilfe eines Vaginitis-Modell bei der Ratte eindrucksvoll die Relevanz der Sap2 zeigen: ein *C. albicans* Stamm mit zerstörtem *SAP2*-Gen war nicht in der Lage die Infektion in der Rattenvagina aufrecht zu erhalten. Auch *SAP1*-deletäre Mutanten zeigten Einbußen in der Virulenz, allerdings geringer ausgeprägt wie bei den *sap2*-Mutanten. Das Fehlen von *SAP3* hatte ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Virulenz, jedoch noch geringer als das Fehlen von *SAP1*. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich eine Hierarchie hinsichtlich des Virulenzpotentials bei Vaginalinfektionen, das wie folgt aussieht: *SAP2* > *SAP1* > *SAP3*. Dies bestätigt auch eine weitere Arbeit, bei der Vaginalschleimhaut mit *SAP1*- bzw. *SAP2*-deletären *Candida*-Stämmen infiziert wurde. Beide Stämme hatten ein drastisch vermindertes Gewebeschädigungspotential. Der Pilz reagierte durch eine Hochregulation von *SAP3*, *SAP4* und *SAP7*, wodurch aber die Virulenzminderung nicht ausgleichen wurde (Schaller, 2003).

Für Mutanten mit fehlendem *SAP4*, *SAP5* oder *SAP6* konnte in diesem Modell keine verringerte Virulenz bei Vaginalschleimhautinfektionen nachgewiesen werden (De Bernardis, 1999). Neue *in vivo*-Analysen zeigen unabhängig vom lokalen Milieu ein Dominieren von *SAP2* und *SAP5* bei Infektionen. Bei der vaginalen Infektion werden zusätzlich vorwiegend *SAP1*, *SAP3* und *SAP8* exprimiert, bei der oralen Infektion sind *SAP1*, *SAP3-4* und *SAP7-8* die zusätzlich exprimierten *SAPs* (Naglik, 2003).

1.5.6 Rolle der SAPs bei systemischen Infektionen

Antigen-Antikörperanalysen liefern den stichhaltigsten Beweis dafür, dass *SAPs* während systemischer Kandidosen exprimiert werden (Rüchel, 1991). In neueren Studien, in denen Meerschweinchen und Mäusen *sap1*-, *sap2*-, *sap3*- und *sap4-6*-Mutanten intravenös verabreicht wurden, konnte gezeigt werden, dass die Tiere im Vergleich zur Kontroll-

gruppe, die einen unveränderten *C. albicans*-Stamm erhalten hatten, höhere Überlebensraten hatten (Hube, 1997; Sanglard, 1997).

Wurden systemisch infizierte Mäuse mit dem Proteasehemmer Pepstatin A behandelt, zeigte sich kaum ein Unterschied zu nicht behandelten Mäusen (Rüchel, 1990; Fallon, 1997). Im Gegensatz dazu entfaltete eine vor der Infektion begonnene Behandlung neutropischer Mäuse mit Pepstatin A mittels intraperitonealer Injektion einen Schutz vor einer ansonsten letal endenden intranasalen Applikation von *C. albicans* (Fallon, 1997). Diese Ergebnisse bescheinigen den SAPs eine wichtige Rolle bei der frühzeitigen Dissemination im Infektionsprozess.

1.5.7 Einfluss des Wirt-Immunsystems auf die SAP-Expression

Zum Einfluss des Immunsystems auf die Expression der sekretorischen Aspartylproteinasen ist wenig bekannt. Es ist aber davon auszugehen, dass der Pilz durch Variation der Expressionsmuster auf verschiedene Situationen reagieren kann und somit auch Interaktionen zwischen dem Immunsystem des infizierten Organismus und dem Pilz bestehen. Eine Arbeit versuchte den Einfluss der Immunkompetenz auf die *SAP*-Expression zu belegen. Hierzu wurden immunkompetente Mäuse und immundefiziente, gnotobiotische (gnotobiotisch: keimfreier Organismus) Mäuse im Oroösophageal-Trakt mit *C. albicans* infiziert und die *SAP*-Expression verglichen. In beiden Tiergruppen wurden alle zehn *SAPs* exprimiert und es waren keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster feststellbar (Schofield, 2003). Dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass *C. albicans* auf bestimmte humorale Faktoren mit einer proteolytischen Aktivität reagiert.

1.5.8 Die SAP-Familie als potentieller therapeutischer Angriffspunkt

HIV-Patienten, die ein "highly active anti-retroviral treatment" (HAART) erhalten leiden deutlich seltener an *Candida*-Infektionen als HIV-Patienten, die diese Medikation nicht bekommen. Diese interessante klinische Beobachtung ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht nur auf den besseren Immunstatus dieser Patienten zurückzuführen, sondern auch auf die Proteinase-Inhibitoren, die ein wichtiger Bestandteil der HAART sind (Munro, 2002). Es gibt vielversprechende Ansätze, die den Effekt von HIV-Proteinasehemmern auf die *SAP*-Expression *in vitro* und *in vivo* belegen (Bein, 2002). Blanco und Mitarbeiter

(2003) konnten zeigen, dass Ritonavir konzentrationsabhängig die Wachstumsrate von *C. albicans* senkt, allerdings nur auf stickstoffarmen Nährböden, die die *SAP*-Expression anregen. Saquinavir hatte in dieser Arbeit keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten.

In einer weiteren Arbeit wurden *C. albicans*-Stämme, die von erkrankten Patientinnen entnommen worden waren, auf Nährböden mit Hämoglobin als einziger Stickstoffquelle angezüchtet. Durch den Aufhellungshof, der durch die Proteinolyse um die Pilzkultur herum entsteht, können Rückschlüsse auf die proteolytische Aktivität des *Candida*-Stammes gezogen werden bzw. die Effektivität einer Proteinase-Inhibitor-Therapie überwacht werden. In diesem Modell konnte eine gute anti-proteolytische Wirksamkeit von Pepstatin nachgewiesen werden. Die HIV-Proteinase-Inhibitoren Saquinavir, Ritonavir, Nelvinavir und Indinavir hatten keinen hemmenden Effekt auf die proteolytische Aktivität der getesteten *Candida*-Stämme (Dostal, 2003). Weitere, insbesondere klinische Prüfungen sind von Nöten, um das therapeutische Potential der Proteinase-Inhibitoren und die Patientengruppe, die von einer Proteinase-Inhibitor-Therapie profitiert genauer eingrenzen zu können.

1.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Herausarbeitung eines für die Vaginalinfektion typischen Proteinase-musters von *Candida albicans in vivo*. Dazu waren folgende Schritte durchzuführen:

1. Entnahme von Vaginalsekretproben von Frauen, die akut unter einer Vaginalkandidose leiden, unter RNA-konservierenden Bedingungen. An einer akuten Kandidose leiden definitionsgemäß Frauen, die im letzten Jahr nicht mehr als vier Infektionen gehabt haben.
2. Entnahme von Vaginalsekretproben von Frauen, die im Moment der Probenentnahme keine Beschwerden im Sinne einer Vulvovaginalkandidose beklagen (Kontrollgruppe I), aber mit *C. albicans* besiedelt sind, unter RNA-konservierenden Bedingungen.
3. Entnahme von Vaginalsekretproben von Frauen, bei denen keine Besiedelung mit *C. albicans* nachweisbar ist (Kontrollgruppe II), unter RNA-konservierenden Bedingungen.

4. Erstellen eines Anamnesebogens, der über die Dauer und Häufigkeit der Beschwerden, Grunderkrankungen und prädisponierende Erkrankungen Aufschluß gibt.
5. Ansetzen einer Pilzkultur bei jeder Patientin.
6. Bestimmung des Expressionsmusters der Sekretorischen Aspartylproteinasegene *SAP1-6* und *SAP8-9* von *C. albicans* aus den Vaginalsekretproben mittels rT-PCR.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Wie ist das Expressionsmuster sekretorischer Aspartylproteinasen von *C. albicans* bei Vaginalinfektion?
- Wie ist das Proteinasmuster im Vergleich dazu bei asymptomatischer Kolonisation der Vagina mit *C. albicans*?
- Gibt es feste Kombinationen von verschiedenen Proteinase?
- Wie viele Proteinase werden gleichzeitig exprimiert?
- Gibt es eine Proteinase deren gezieltes Ausschalten eine Infektion der Vagina mit *C. albicans* verhindern könnte?
- Gibt es Hinweise dafür, dass die Isoenzymfamilie der sekretorischen Aspartylproteinase der wichtigste Virulenzfaktor von *C. albicans* sind?
- Wie ist die Methode der rT-PCR bei der *in vivo*-Analyse von Expressionsmustern einzustufen?

2 Methode

2.1 Probenentnahme und Aufbewahrung

2.1.1 Entnahmeorte

Patientinnen, die an einer akuten *Candida*-Infektion des Genitaltraktes leiden, suchen in der Regel ihren niedergelassenen Gynäkologen auf, so dass es sich als schwierig herausstellte, über die mikrobiologische Sprechstunde der Frauenklinik Großhadern Proben zu beziehen. Erfreulicherweise entnahmen die niedergelassenen Kollegen Frau Dr. Schulze (München), Herr Dr. Deininger (München), Herr Dr. Ullrich (München) und Herr Dr. Jauernick (Deggendorf), denen ich sehr zu Dank verpflichtet bin, Proben. Die Proben der asymptomatischen Patientinnen stammen aus der Frauen-Poliklinik Großhadern.

2.1.2 Entnahmetechnik

Zu Beginn der Arbeit wurden die Proben unmittelbar nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Art der Probenkonservierung konnte allerdings nicht beibehalten werden, da die niedergelassenen Gynäkologen nicht über derartige Möglichkeiten verfügten. Es wurde daraufhin auf die Substanz *RNAlater* (Ambion) zur Konservierung der Proben zurückgegriffen. In Testreihen konnte gezeigt werden, dass diese Art der Konservierung für unsere Zwecke geeignet war. Hierzu wurden *C. albicans*-Zellen aus der Kultur in *RNAlater* resuspendiert und bei -20°C und -8°C für ein, drei und sieben Tage gelagert. In allen sechs Fällen gelang der Nachweis von *C. albicans* RNA mittels rT-PCR.

Ein großer Teil der Proben wurde mittels einer Impföse vom Spekulum gekratzt und dann in *RNAlater* resuspendiert. Diese Methode hat den Nachteil, dass dabei nur wenig Material gewonnen wird. Möglicherweise erklärt dies einen Teil der negativen rT-PCR Ergebnisse trotz positivem kulturellem Nachweis (siehe Abschnitt 3.3.1).

Die zweite Methode, die erst im fortgeschrittenen Stadium der Arbeit zur Anwendung kam, ermöglicht die Gewinnung größerer Mengen an pilzlichem Material. Mit einer sterilen Spritze wurden 2 ml physiologische Kochsalzlösung in das Scheidenumen ein-

gebracht. Mit einem sterilen Wattetupfer wurden das Scheidengewölbe ausgewaschen und daraufhin wieder 2 ml der nunmehr milchigen Flüssigkeit entnommen. 0,5-1 ml des Fluor-Kochsalzgemisches wurde mit 1 ml *RNAlater* vermischt, der übrige Teil diente zur kulturellen Anzucht.

2.1.3 Aufbewahrung

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme und der Vermischung mit *RNAlater* in der Praxis der niedergelassenen Gynäkologen bei -8°C eingefroren. Nach der Überführung in das Labor wurden sie baldmöglichst verarbeitet. Bis dahin lagerten sie bei -20°C . Weitere Zeitpunkte zur risikofreien Lagerung ergeben sich nach der Homogenisierung in Phenol. Nach diesem Schritt lassen sich die Proben laut Herstellerangaben (peQlab) einige Monate ohne RNA-Verluste bei -70°C lagern.

2.2 Mikrobiologische Methoden

Etwa 100 μl des Fluor-Kochsalzgemisches wurde in Sabouraud-Bouillon (Biomerieux) gegeben und für 24 h bei 37°C bebrütet. Die Bouillon wurde der Agarplatte vorgeschaltet, da sie wesentlich sensitiver als die Agarplatte allein ist (Petersen, 1999). Danach erfolgte eine Überimpfung auf Sabouraud-Agarplatten (Biomerieux). Wenn sich hier Kulturen zeigten, wurden diese zur Artspezifizierung auf Chromagarplatten überimpft und für 24 h im Dunkeln bebrütet, so dass sich die Kulturen charakteristisch anfärbten.

Auf Chromagar färben sich die Kulturen wie folgt (Weissenbacher, 1998):

<i>Candida albicans</i> :	grünlich
<i>Candida glabrata</i> :	rosa
<i>Candida tropicalis</i> :	blau
<i>Candida krusei</i> :	hellrosa

2.3 Molekularbiologische Methoden

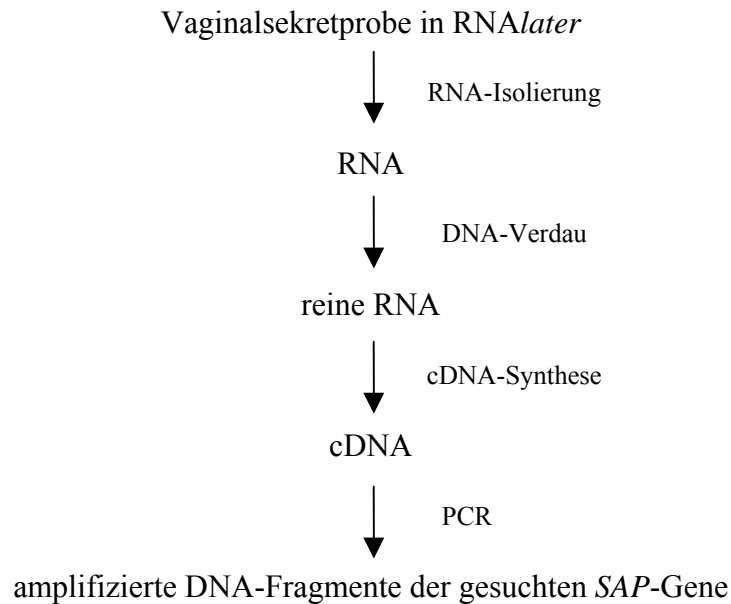


Abbildung 3: Flussdiagramm der molekularbiologischen Schritte und ihrer Zwischenprodukte

2.3.1 RNA-Isolierung

Die mit RNAlater tiefgefrorenen Proben wurden in Eppendorf Save-Lock-Tubes zentrifugiert (5.000 Umdrehungen/min) und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde in 1 ml peqGOLD RNAPure® (peQlab) resuspendiert. Es handelt sich um eine Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur RNA-Extraktion (Chomczynski, 1987). Zur Homogenisierung wurden ca. 0,5 ml Glas Beads (Sigma) zugegeben und die Probe hierauf 15-30 Minuten mit dem Vortex-Gerät durchgemischt. Naglik et al. (1999) konnten zeigen, dass nach 30 min ein optimaler Zellaufbruch stattgefunden hat.

Aus den auf diese Weise mechanisch aufgebrochenen Zellen kann die DNA und RNA entweichen. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben. Nachdem die Proben 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt worden waren, wurden sie 3-10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 12.000 g, die zur Trennung der Probe in drei Phasen führte. Im unteren Teil des Tubes befindet sich die Phenol-Chloroform-Phase, welche ebenso wie die weißliche Interphase DNA und Proteine enthält. Die RNA ist ausschließlich in der

wässrigen Phase angereichert, die sich als oberste Schicht im Röhrchen befindet. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Röhrchen überführt. Hier wurde mit einem Milliliter Isopropanol die Präzipitation der RNA herbeigeführt, die in den folgenden 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur stattfindet. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 12.000 g für 10 Minuten lagert sich das RNA-Präzipitat am Boden des Tubes ab. Laut Hersteller läßt es sich als gelartiges Pellet erkennen. Die Erfahrung hat aber gezeigt, dass es in der Regel nicht sichtbar ist, bzw. dass es ein gutes Zeichen für die Reinheit der RNA-Präparation und damit das Gelingen der rT-PCR ist, wenn kein Pellet zu sehen ist, da in diesem Fall keine starke Verunreinigung mit Proteinen vorliegt und somit auch weniger RNasen in der Lösung sind. Die Flüssigkeit wurde dekantiert, 1 ml Ethanol zugegeben und das RNA-Pellet durch Vortexen in Lösung gebracht. Anschließend wurde die RNA durch neuerliches Zentrifugieren bei 12.000 g für 10 Minuten erneut pelletiert. Die RNA-Isolierung ist damit abgeschlossen.

2.3.2 DNA-Verdau

Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wird vor die cDNA-Synthese eine DNA-Verdauung geschaltet. Das Ethanol wurde abgegossen und die restliche Flüssigkeit nach kurzer Zentrifugation vorsichtig abpipettiert. Das RNA-Pellet wurde in 4 µl DEPC-Wasser (Invitrogen) und 1 µl RNase-Inhibitor (Invitrogen) resuspendiert. Das Gesamtvolumen von 5 µl wurde wie folgt verwendet: 1 µl wurde für die spätere Negativkontrolle abgenommen, mit 1 µl 10x DNase-Puffer (Invitrogen), 1 µl DNase I (Invitrogen) und 7 µl DEPC-Wasser vermischt. Die restlichen 4 µl wurden ebenfalls mit 1 µl 10x DNase-Puffer und DNase I, sowie 4 µl DEPC-Wasser vermischt. Die genannten Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert und dann bei Raumtemperatur für 15 Minuten stehen gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA gestoppt und das Enzym hitzeinaktiviert (10 Minuten bei 65°C).

2.3.3 Reverse Transkription

Dem gesamten Reaktionsgemisch wurde 1 µl oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und danach direkt für 1 bis 2 Minuten auf Eis gestellt. Jetzt wurden 1 µl eines dNTP-Gemisches (jeweils

10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP; Invitrogen), 2 µl DTT (0,1 M; Invitrogen) und 4 µl 5x Puffer (250 mM Tris-Cl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) zugegeben. Dieses Gemisch wurde für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wurde 1 µl SUPERSCRIPT II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (200 U; Invitrogen) zugegeben und das Gemisch weitere 50 Minuten bei 42°C gehalten. Der Negativkontrolle wurden die gleichen Mengen der Substanzen zugesetzt, mit Ausnahme der SUPERSCRIPT II. Auf diese Weise war die Negativkontrolle ein sensibles Werkzeug zur Erkennung von DNA-Kontaminationen. Es erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 70°C für 15 Minuten. Um die in der Lösung verbliebene RNA zu entfernen, erfolgte ein RNase-Schritt. Dem Gemisch wurde 1 µl RNaseH (Invitrogen) beigelegt und die Reaktion bei 37°C für 20 Minuten aufrechterhalten.

2.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Proben wurden unmittelbar nach dem RNase-Schritt weiterverarbeitet. Zur Amplifizierung von *SAP1-6* und *SAP8-9* und des Genes des Elongationsfaktors aus cDNA wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet (Saiki, 1988).

2.3.4.1 Oligonukleotide

Insgesamt kamen neun verschiedene Oligonukleotidpaare für die Amplifikation von Fragmenten der Proteinasegene *SAP1-SAP6* und *SAP8-SAP9* und des Elongationsfaktors *EFB1* zur Anwendung. Sie wurden freundlicherweise von Dr. Schaller zur Verfügung gestellt und entsprechen größtenteils publizierten Sequenzen (Schaller 1998). Die Position der Primer innerhalb der Gene kann im Anhang eingesehen werden.

SAP1: 5'-AGGGAAAGGTATTTACT-3'
 5'-CAGTTTCAATTCAGCTTGG-3'
Länge des Amplifikationsproduktes: 551bp

SAP2: 5'-CTTAGGTCAAGGCAGAAATACTG-3'
 5'-CCTAAAGCATTCCCAGTTAC-3'
Länge des Amplifikationsproduktes: 1081bp

SAP3: 5'-TGGATTGGAACATTTCTAATTC-3'
 5'-CAATCTCCAGAGGAGTACTTCC-3'
Länge des Amplifikationsproduktes: 1094 bp

<u>SAP4:</u>	5'-GTCCTGGTGGCTTCGTTGC-3' 5'-TTTTCATTAACAACCAACCATTTC-3' Länge des Amplifikationsproduktes: 732 bp
<u>SAP5:</u>	5'-ATAATTAATCTAAAGTCAAAGTTC-3' 5'-CCATACATTCAAATGGCAAGCTCG-3' Länge des Amplifikationsproduktes: 1550 bp
<u>SAP6:</u>	5'-CATAAATGACTTCAAAATATAAAT-3' 5'-TTCTTCAAACGTTTAAATTCTCT-3' Länge des Amplifikationsproduktes: 1516 bp
<u>SAP8:</u>	5'-GTTGACACAGGTTCTTCTG-3' 5'-CTCTATAAAGTAGAAATACTTGA-3' Länge des Amplifikationsproduktes: 905 bp
<u>SAP9:</u>	5'-TAAACCAAACATAGTAGGA-3' 5'-CTGCTAAGGCACCTTTCAA-3' Länge des Amplifikationsproduktes: 1353 bp
<u>EFB1:</u>	5'-CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG-3' 5'-ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC-3' Länge des Amplifikationsproduktes: 891 bp auf DNA-Ebene 526 bp auf cDNA-Ebene

2.3.4.2 Reaktionsgemisch

Der Master Mix (Reaktionsgemisch, dem 1 µl der cDNA-Probe zugesetzt wird) setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 2: Zusammensetzung des Master Mixes.

	Konzentration	Volumen
Wasser		30,75 µl
PCR-Puffer	10x	5,00 µl
Magnesiumchlorid	25 mM	3,00 µl
5'-Primer	100 µM	1,00 µl
3'-Primer	100 µM	1,00 µl
dNTPs	40 mM	8,00 µl
Taq-Polymerase	10 U/µl	0,25 µl
Gesamtvolumen		49,00µl

2.3.4.3 Hot Start

Um in der ersten Amplifikationsrunde unspezifische Primerbindungen zu vermeiden wurde die Methode der Heißstart-PCR (hot start) angewendet. Ein wesentliches Charakteristikum dieser Methode ist es, dass eine oder mehrere wichtige Reaktionskomponenten der PCR erst nach der Denaturierung der Matrize zugegeben werden (Chou, 1992). Beim Durchlaufen niedriger Temperaturen besteht für die Primer die Möglichkeit unspezifisch zu binden. Wenn bereits alle für die Amplifikation benötigten Komponenten im Reaktionsgemisch verfügbar sind, können so unspezifische Produkte amplifiziert werden. Dies wird durch den Hot Start verhindert, da die niedrigste Temperatur, die das vollständige Reaktionsgemisch während der gesamten Prozedur durchläuft, die Annealing-Temperatur der Primer ist.

Die ursprüngliche Methode von Chou wurde modifiziert. So wurde nicht mit einer Wachsschicht gearbeitet, sondern die restlichen Reaktionspartner erst bei Erreichen der Zieltemperatur in die heiße Lösung pipettiert. Es ergibt sich folgender Ablauf: die Probe, das Wasser, die Primer und das Magnesiumchlorid (Gesamtvolumen: 36,75 µl) werden für zwei Minuten bei 95°C gehalten und dann das Gemisch auf 85°C heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur bleiben die cDNA-Doppelstränge auseinandergewichen, die Temperatur ist aber zu hoch, als dass die Primer binden könnten. Bei 85°C werden die restlichen Komponenten (Puffer, dNTPs und die Taq-Polymerase; Volumen: 13,25 µl) zugegeben (siehe Abbildung 4). Das Herunterkühlen auf 85°C hat sich bewährt, da die Taq-Polymerase auf den raschen Temperaturwechsel von -20°C auf 95°C empfindlich reagiert und einige Moleküle zerstört werden. Nach der Zugabe der restlichen Komponenten beginnen die normalen PCR-Zyklen.

2.3.4.4 Protokoll

Das Protokoll gibt die Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklen und ihre Gesamtanzahl wieder. Für die neun verschiedenen PCR-Ansätze wurde jeweils das gleiche Protokoll verwendet. Das an den Hot Start anschließende PCR-Protokoll sah wie folgt aus:

$[95^{\circ}\text{C}/3'-52^{\circ}\text{C}/3'-72^{\circ}\text{C}/3']\times 1-[95^{\circ}\text{C}/1'-52^{\circ}\text{C}/1'-72^{\circ}\text{C}/1']\times 35-[72^{\circ}\text{C}/10']\times 1$

Bei 95°C weichen die DNA-Doppelstränge auseinander (denaturation), bei 52°C binden die Primer (annealing) und bei 72°C arbeitet die Taq-Polymerase (extension). Einem Zyklus mit jeweils drei Minuten Zeitspanne pro Temperatureinheit folgen 35 Zyklen mit jeweils einer Minute Zeitspanne pro Temperatureinheit. Nach den Zyklen schließt sich

eine 10 minütige Phase bei 72°C an, in der die unvollständigen Amplifikate durch die Taq-Polymerase fertiggestellt werden sollen.

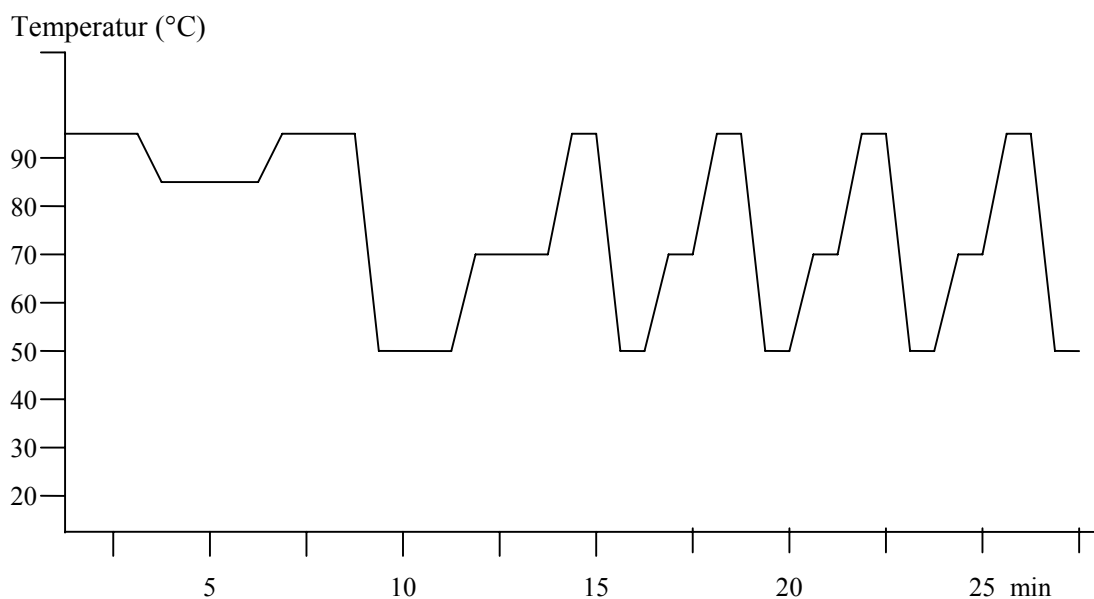


Abbildung 4: Zyklischer Temperaturverlauf der ersten vier Zyklen der PCR. Hot Start ist dargestellt. Bei 85°C werden die Puffer, dNTPs und die Taq-Polymerase zugegeben. Es schließt sich der erste Zyklus mit jeweils 3-minütiger Dauer jeder Temperaturstufe an, diesem Zyklus folgen 35 Zyklen, deren Temperaturstufen jeweils für eine Minute gehalten werden.

2.3.5 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Flachgelapparaturen durchgeführt. Die Agarose (5%) wurde in 1x TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit 1%iger Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die Nukleinsäuren kann die DNA unter UV-Licht detektiert werden. Die aufzutragenden Proben wurden wie folgt vorbereitet: 8 µl Probe wurden mit 2 µl Loading Solution (Bromphenol Blue; Promega) vermischt. Die Elektrophorese erfolgt bei 300 V und 120 mA für 15 Minuten, als Laufpuffer diente 1x TBE Puffer (1,0 mM Tris-Borat pH 8,3, 20 mM EDTA). Nach dem Gellauf wurde die DNA im Gel durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm sichtbar gemacht und das Gel fotografiert (siehe Abbildung 5). Als Standard wurde Phi X 174 DNA-HaeIII Digest (New England Biolabs) verwendet (siehe Abbildung 6).

Spur:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PCR:	-	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>	<i>EFBI</i>	<i>EFBI</i>	<i>EFBI</i>
DNA:	Standard	cDNA	cDNA	cDNA	cDNA	cDNA	cDNA	cDNA	cDNA	cDNA	genomische DNA	-

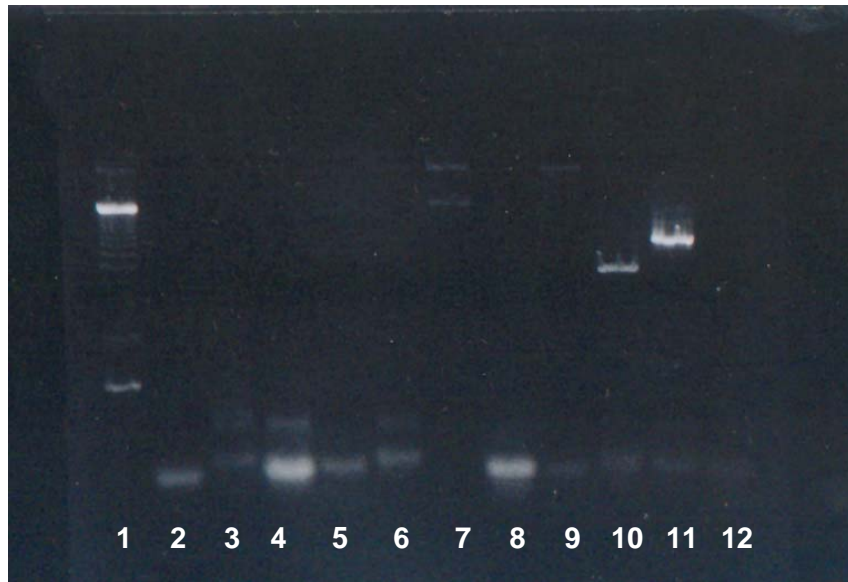


Abbildung 5: Beispiel für eine positive Probe (Probe Nr.: 23) mit *SAP6* (Spur 7; 1516 bp). Gut zu sehen ist der Unterschied zwischen *EFBI*-Amplifikaten von cDNA (Spur 10; 526 bp) und genomischer DNA (Spur 11; 891 bp).

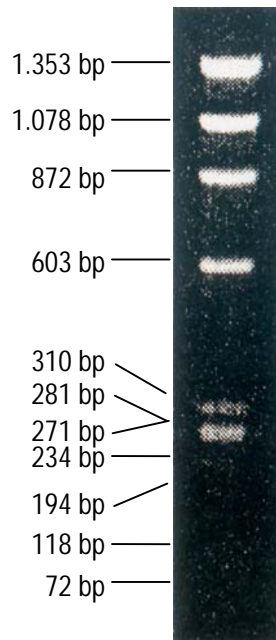


Abbildung 6: Standard, Phi X 174 DNA HaeIII Digest (New England Biolabs).

2.1.6 Kontrollmechanismen

2.3.6.1 Kontamination mit genomischer DNA

Um eine Kontamination der cDNA-Präparationen mit genomischer DNA auszuschließen wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Dazu wurde von dem in DEPC-Wasser resuspendierten RNA-Pellet ein Teil abgenommen, mit dem identisch verfahren wurde wie mit der restlichen Probe. Lediglich auf die Zugabe der reversen Transkriptase wurde verzichtet. Mit dieser Präparation wurde standardmäßig eine PCR mit *EFBI*-spezifischen Primern durchgeführt. Dadurch wurde kontrolliert, dass weder die cDNA noch die verwendeten Reagenzien, Primer und Enzyme mit genomischer oder sonstiger Template-DNA verunreinigt waren.

2.3.6.2 RNA-Nachweis

Eine weitere Kontrolle bestand im Nachweis eines *EFBI*-Amplifikationsproduktes. Dieser für die Proteinsynthese wichtiger Faktor wird konstitutiv exprimiert. Das Gen ist 1141 bp lang und beinhaltet ein 365 bp langes Intron, das auf RNA-Ebene durch Spleißen entfernt wird. Daraus ergibt sich, dass das in der PCR erzielte Amplifikat eine unterschiedliche Länge besitzt, je nachdem, ob es von einer DNA-Matrize oder von einer cDNA-Matrize abgelesen wurde (siehe Abbildung 5). Durch diese Kontrolle konnte nicht nur das Vorhandensein von *C. albicans*-RNA in der Probe nachgewiesen, sondern auch Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Dies ist notwendig, da die Proteinasegene keine Intronsequenzen enthalten und deswegen hier nicht zwischen den Matrizen unterschieden werden kann.

3 Ergebnisse

3.1 Patientengut

Es wurden Proben von 174 Patientinnen ausgewertet, wobei 47 Proben von Kontrollpatientinnen ohne Beschwerden im Sinne einer Vulvovaginalkandidose stammten.

3.1.1 *Gruppe der symptomatischen Patientinnen*

Die symptomatische Patientengruppe umfasste 127 Frauen, die an einer akuten Vaginalkandidose (nicht mehr als vier Infektionsepisoden pro Jahr) litten. Die Patientinnen waren zwischen 16 und 64 Jahren alt, wobei der Altersdurchschnitt bei 33 Jahren lag. Es wurden Patientinnen in die Arbeit aufgenommen, die bis zu vier Infektionen im letzten Jahr gehabt hatten, wobei die aktuelle Infektion mitgezählt wurde. Im Durchschnitt hatten die Patientinnen 1,8 symptomatische Genitalmykosen im letzten Jahr.

Unter den 132 Patientinnen befanden sich 11 Schwangere (8%). Sie befanden sich in der 9. bis 39. Schwangerschaftswoche, der Durchschnitt lag bei 29 Schwangerschaftswochen. Unter den 45 Proben, bei denen ein RNA-Nachweis gelungen ist (siehe unten), befand sich keine Probe einer schwangeren Patientin.

Eine Antibiotikatherapie als Auslöser der Beschwerden fand sich bei 12% der Patientinnen, 22% nahmen hormonelle Kontrazeptiva, 5% trugen einen Intrauterinpeppar. Eine Hormondauertherapie nahmen 4% der Frauen.

3.1.2 *Gruppe der asymptomatischen Patientinnen*

Die asymptomatische Gruppe umfasste 47 Patientenproben. Die Patientinnen waren im Alter zwischen 24 bis 67 Jahren, wobei der Altersdurchschnitt bei 37 Jahren lag. In die Kontrollgruppe I wurden Patientinnen aufgenommen, die die gynäkologische Sprechstunde zur Krebsvorsorge oder zur Behandlung von Beschwerden, die nicht im Zusammenhang mit einer Vulvovaginalkandidose standen, aufgesucht hatten und keine Symp-

tome im Sinne einer Vaginalkandidose beklagten. Unter diesen 42 Kontrollpatientinnen befanden sich 15 schwangere Frauen (36%), deren Schwangerschaften sich zwischen der 14. und 38. Schwangerschaftswoche befanden. Im Durchschnitt waren die Schwangeren in der 24. Schwangerschaftswoche.

Kontrollgruppe II enthielt Proben von menopausalen Frauen, wobei Vaginalkandidosen in dieser Altersgruppe eigentlich nicht vorkommen. Diese Proben wurden als Negativkontrollen verwendet (Proben Nr. 24, 32, 57, 66 und 72).

3.2 Kultureller Nachweis

Bei mehr als der Hälfte der analysierten Proben wurde eine Kultur angelegt, um Aussagen über die Sensitivität und Spezifität der rT-PCR machen zu können (Tabelle 3). Von den 127 symptomatischen Patientinnen wurden in 64 (50%) Fällen eine Kultur angesetzt. Bei den 64 beimpften Platten fand sich in 48 Fällen *C. albicans* (75%), zweimal *C. glabrata* (3%) und 14 Proben waren kulturnegativ (22%). Von den 41 untersuchten Proben von Kontrollpatienten (98%) fand sich in 6 Fällen eine Kolonisation mit *C. albicans* (14%), 35 waren in der Kultur negativ (86%).

Tabelle 3: Ergebnisse der kulturellen Anzuchtung

Patientengruppe	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	Negatives Kulturergebnis
Symptomatische Patientinnen	48 (75%)	2 (3%)	14 (22%)
Asymptomatische Patientinnen	6 (14%)	-	35 (86%)

3.3 Proteinaseennachweis

3.3.1 Spezifität und Sensitivität der Methode

Zu Beginn der Arbeit wurden Tests durchgeführt, um Reproduzierbarkeit, Spezifität und Sensitivität der rT-PCR zu bestimmen. So wurden bei zehn Proben (Probe 4 bis 14) pro Patientin zwei Proben entnommen und ausgewertet. Hier fanden sich in allen Fällen identische Signale. Dies wurde als Hinweis für die Reproduzierbarkeit der Methode angesehen. Desweiteren konnten für jedes Proteinasegen sowie für *EFBI* zumindestens in den Patientenproben Amplifikate nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5), was bedeutet, dass mit den verwendeten Primerkombinationen die Expression sämtlicher untersuchten Gene zumindestens theoretisch nachweisbar war. Allerdings kann keine Aussage über die relative Expressionsstärke getroffen werden.

Bei allen Proben wurden parallele Negativkontrollen durchgeführt, um das Vorhandensein von DNA-Kontaminationen auszuschließen. Dabei konnten in keinem Fall PCR-Produkte nachgewiesen werden. Außerdem bestätigte die Länge des *EFBI*-Amplifikationsprodukts in allen Fällen eine Amplifikation von cDNA-Matrizen. Damit konnte eine Verunreinigung durch genomische DNA ausgeschlossen werden. Zudem wurden Proben von postmenopausalen Frauen (Probe Nr. 24, 32, 57, 66 und 72) analysiert, bei denen davon ausgegangen werden konnte, dass keine Besiedelung mit *C. albicans* vorlag. Diese Proben waren sowohl im *SAP*- als auch *EFBI*-Signal negativ. Diese Kontrollen lassen den Schluss zu, dass die gewonnenen Signale wirklich von *C. albicans*-mRNA stammen

Um Aussagen zur Sensitivität der rT-PCR machen zu können, wurden die Ergebnisse der kulturellen Anzucht mit den rT-PCR-Ergebnissen verglichen. Dabei zeigte sich ein Unterschied zwischen den Proben symptomatischer und asymptomatischer Patientinnen. Während sich bei den symptomatischen Patientinnen *C. albicans*-RNA in 54% der Fälle mit *C. albicans*-Kulturergebnis und in keiner der Proben mit negativen Kulturergebnis nachweisen ließ, lagen diese Werte bei der asymptomatischen Kontrollgruppe bei über 60% (siehe Tabelle 4). Das heißt, im ersten Fall waren die Kulturergebnisse sensitiver, wohingegen sich bei den Kontrollpatientinnen die rT-PCR teilweise als sensitiver als der kulturelle Nachweis von *C. albicans* herausstellte. Da die Kontrollproben im Hause entnommen und zügig im Labor verarbeitet wurden, während die Proben der symptomatischen Patientinnen aus Praxen niedergelassener Kollegen stammten, liegt die Vermu-

tung nahe, dass bei der Durchführung von rT-PCR-Analysen die Probenentnahme und der Transport der Proben eine entscheidende Rolle spielen. Längere Lagerungs- und Transportzeiten scheinen die Sensitivität deutlich zu beeinflussen.

Tabelle 4: *C. albicans* Nachweis mittels kultureller Anzuchtung im Vergleich mit der rT-PCR.

Patientengruppe	Kulturergebnis	<i>C. albicans</i> RNA nachweisbar	<i>C. albicans</i> RNA nicht nachweisbar
Symptomatische Patientinnen	<i>C. albicans</i>	26 (54%)	22 (46%)
	<i>C. glabrata</i>	0 (0%)	2 (100%)
	negativ	0 (0%)	14 (100%)
Asymptomatische Patientinnen	<i>C. albicans</i>	4 (67%)	2 (33%)
	negativ	22 (63%)	13 (37%)

Die rT-PCR ist natürlich kein diagnostisches Instrument zum Nachweis von *C. albicans*, hier bietet sich eine PCR mit einem spezifischen Zielabschnitt auf der DNA an (Crampin, 1993). Die in der Tabelle gezeigten Zahlen deuten lediglich das Potential an Sensitivität an, das eine auf dem Nachweis von Nukleinsäuren beruhende Methode besitzt. Außerdem lässt sich auch die Störanfälligkeit der Methode ablesen. Trotz positivem kulturellem Nachweis bei 54 Patientinnen (48 Proben symptomatischer und 6 Proben asymptomatischer Frauen) ließ sich nur in 30 Fällen *Candida*-RNA finden. Dies hängt wohl mit der Fragilität des RNA-Moleküls zusammen, das sehr empfindlich gegen Temperaturwechsel ist. Zwar ist die Substanz *RNAlater* in der Lage, RNA zu konservieren, aber auch mit Benutzung dieser Substanz ist eine sofortige Kühlung obligat und man unterliegt einer zeitlichen Limitierung bei der Bearbeitung. Zudem existieren im Vaginalsekret unbekannte Hemmstoffe der PCR und rT-PCR.

3.3.2 Symptomatische Patientengruppe

3.3.2.1 Häufigkeit der einzelnen SAPs

Mit Hilfe der rT-PCR wurde die Expression der Proteinasegene *SAP1-6*, *SAP8* und *SAP9*, sowie des Elongationsfaktorgens *EFBI* bestimmt. Ein RNA-Nachweis gelang bei 45 Proben (siehe Tabelle 5). Ein Überblick über die Verteilung der gefundenen *SAP*- und *EFBI*-Expressionsdaten kann Abbildung 7 entnommen werden.

Tabelle 5: RNA-positive Proben symptomatischer Patientinnen (n.a.: nicht analysiert)

Probennummer	Kulturergebnis	Expressionsnachweis mit rT-PCR								
		<i>EFB1</i>	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>
2	<i>C. albicans</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-
10	n.a.	+	-	-	-	+	-	-	-	-
13	n.a.	+	+	-	-	+	-	-	-	-
15	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-
18	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-
20	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	+
21	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
22	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-
25	<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-
26	n.a.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
28	n.a.	-	-	-	-	+	-	-	-	-
29	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
36	n.a.	+	-	+	-	-	-	-	-	+
37	n.a.	+	-	-	-	-	-	-	-	-
38	n.a.	+	-	-	-	-	-	+	-	-
39	n.a.	+	+	-	-	-	-	-	-	-
46	n.a.	+	-	-	-	-	+	-	-	-
49	<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-
50	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
52	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
53	<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	+
59	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
61	<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
67	<i>C. albicans</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-
68	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
69	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-
70	<i>C. albicans</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+
71	<i>C. albicans</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+
82	<i>C. albicans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
83	<i>C. albicans</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-
84	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	+	-
100	n.a.	-	-	-	-	+	-	+	-	+
102	n.a.	-	-	-	-	-	-	+	-	+
103	n.a.	-	-	-	+	+	-	-	-	+
106	n.a.	+	+	+	+	-	-	+	+	+
110	n.a.	-	-	-	+	-	-	+	-	-
126	n.a.	+	-	-	-	-	-	+	-	-
127	n.a.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
132	n.a.	+	-	-	-	-	+	-	-	-
134	n.a.	-	+	-	-	-	-	-	-	+
155	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
157	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Summe:		26	14	5	6	15	5	15	8	10

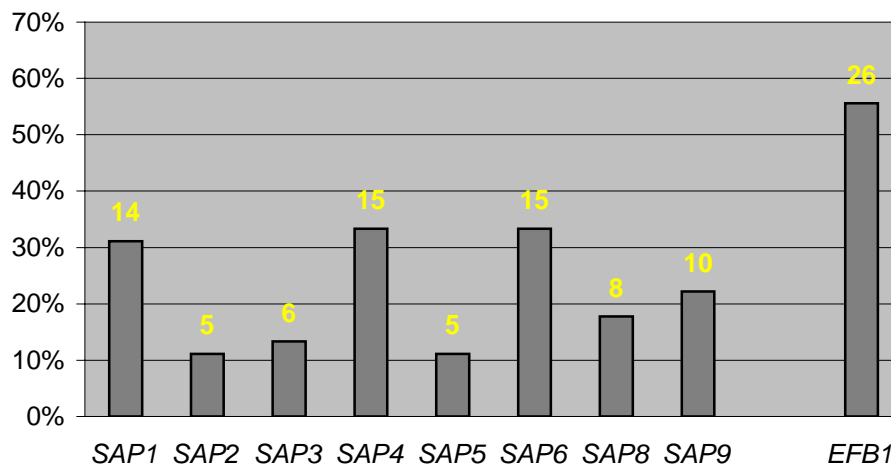


Abbildung 7: Relative Häufigkeit der *SAP*- und *EFB1*-Expression bei symptomatischen Patientinnen (n = 45). Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

Es fällt auf, dass die Gene *SAP1*, *SAP4* und *SAP6* am häufigsten exprimiert wurden, und zwar *SAP1* in 31% der Proben, *SAP4* in 33% der Proben und *SAP6* ebenfalls in 33% der Proben. *SAP2* (11%), *SAP3* (13%) und *SAP5* (11%) wurden dagegen nur selten exprimiert. *SAP8* (18%) und *SAP9* (22%) wurden mäßig häufig gefunden. Das Elongationsfaktorgen *EFB1* wurde als Kontrolle verwendet (siehe Abschnitt 2.6.1). Es wurde davon ausgegangen, dass dieser für die Proteinsynthese benötigte Elongationsfaktor in allen Fällen exprimiert und deswegen nachweisbar sein sollte. In 19 Fällen waren jedoch Proteinasesignale erkennbar, ohne dass eine Expression des Elongationsfaktors nachgewiesen werden konnte. Aufgrund des durchgeführten DNA-Verdaus und der signallosen Negativkontrolle kann aber davon ausgegangen werden, dass in diesen Fällen keine DNA-Kontamination vorliegt. Wahrscheinlich war die Menge an *C. albicans*-RNA zu gering, um ein *EFB1*-Signal zu erhalten, während sich die sehr stark exprimierten *SAP*-Gene nachweisen ließen.

Abbildung 8 zeigt einen Vergleich der *SAP*-Signale zwischen Fällen, in denen *EFB1*-Expression nachgewiesen werden konnte und Fällen, in denen dies nicht gelang. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen: es dominieren jeweils die Proteinasesen *SAP1*, 4 und 6. Deswegen wurden die folgenden Analysen mit dem gesamten Datensatz durchgeführt.

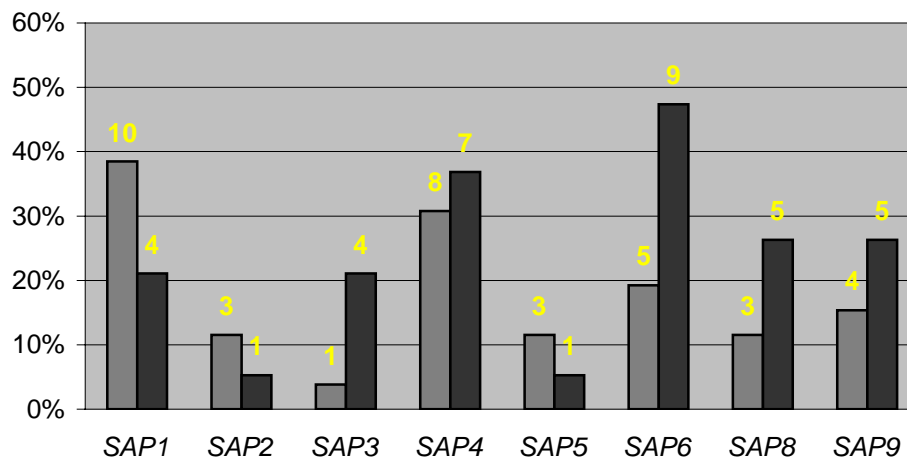


Abbildung 8: Vergleich der relativen Häufigkeit der SAP-Expression bei symptomatischen Patientinnen zwischen Fällen, in denen *EFBI*-Expression nachgewiesen konnte (graue Balken, n = 26) und Fällen, in denen dies nicht gelang (schwarze Balken, n = 19). Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

3.3.2.2 Mehrfachexpressionen

Für die Analyse des Expressionsmusters ist nicht nur die Häufigkeit der einzelnen SAPs von Bedeutung, sondern auch die Kombinationen der SAPs miteinander. Abbildung 9 zeigt auf, wie viele Proteinasen der SAP-Genfamilie gleichzeitig exprimiert waren:

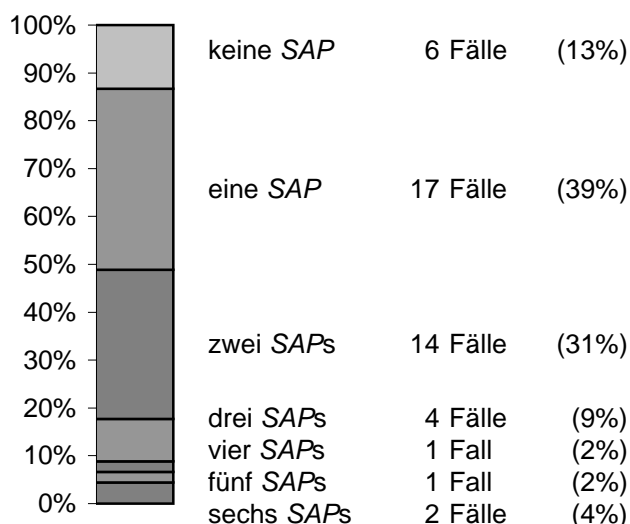


Abbildung 9: Aufschlüsselung der Häufigkeit von SAP-Mehrfachexpressionen bei symptomatischen Patientinnen (n = 45).

Die Proteinasen wurden offensichtlich mehrheitlich alleine (39%) oder in Kombination mit einer einzelnen anderen Proteinase (31%) sezerniert. Drei oder mehr gleichzeitige Expressionen von verschiedenen SAPs kam erheblich seltener vor. Auffällig ist eine nicht unerhebliche Zahl von Patientenproben, bei denen keine SAP-Expression nachweisbar war. Bei diesen sechs Proben war der Elongationsfaktor signalgebend vorhanden, also *Candida*-RNA nachweisbar, allerdings kein SAP-Signal zu verzeichnen. Es wurden die üblichen Beschwerden, Brennen und Juckreiz, beklagt. Lediglich zwei der sechs Patientinnen, bei denen keine SAP-Expression nachweisbar war, wiesen zwar Ausfluß und gelegentliches Brennen auf, jedoch keinen Juckreiz.

Von Interesse war aber nicht nur, welche Proteinase gebildet wurden, sondern auch in welcher Kombination. Dies ist in Tabelle 6 aufgeschlüsselt. Es fallen einige Kombinationen auf, die häufiger anzutreffen waren: *SAP1* war gehäuft mit *SAP4* vergesellschaftet, ebenso *SAP9* häufig mit *SAP4* und mit *SAP6*. Darüber hinaus ließ sich beobachten, dass *SAP6* die am häufigsten alleine gebildet wurde. Dieses Ergebnis ist nicht einfach zu interpretieren (siehe Diskussion), deutet aber darauf hin, dass es bestimmte SAP-Kombinationen geben könnte, die der Pilz abhängig von seiner Infektionsphase bildet. Eine eindeutige Koexpression fand sich aber nicht.

Tabelle 6: Kombinationsmuster der SAP-Expressionen bei symptomatischen Patientinnen

	Koexpression mit								alleinige Proteinase
	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>	
<i>SAP1</i>	X	2	2	7	0	3	3	4	4
<i>SAP2</i>	2	X	2	0	1	3	1	3	0
<i>SAP3</i>	2	2	X	2	1	5	2	4	0
<i>SAP4</i>	7	0	2	X	1	3	4	5	3
<i>SAP5</i>	0	1	1	1	X	1	1	2	2
<i>SAP6</i>	3	3	5	3	1	X	2	6	6
<i>SAP8</i>	3	1	2	4	1	2	X	2	2
<i>SAP9</i>	4	3	4	5	2	6	2	X	0
Koexpression	21	12	18	22	7	23	15	26	

3.3.2.3 SAP-Expression in Abhängigkeit von der Beschwerdedauer

Die SAP-Expression wurde im Hinblick auf die Dauer der Symptome ausgewertet, um Aussagen darüber zu treffen, ob die Expression einzelner SAPs spezifisch für zeitlich auf-

einanderfolgende Infektionsphasen ist. Aus Tabelle 7 kann ersehen werden, dass sich das Expressionsmuster durchaus mit der Dauer der Erkrankung veränderte.

Tabelle 7: SAP-Expression in Abhängigkeit von der Beschwerdedauer

Beschwerdedauer	SAP1	SAP2	SAP3	SAP4	SAP5	SAP6	SAP8	SAP9	keine SAP-Expression
1 Tag (n = 4)	2	1	1	1	-	2	1	2	1
2 Tage (n = 11)	4	1	1	1	1	4	-	-	1
3 Tage (n = 10)	2	-	2	8	1	2	3	3	2
4 Tage (n = 8)	2	1	-	2	1	2	1	1	1
5 Tage (n = 1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-
6 Tage (n = 4)	2	-	-	2	-	2	1	2	1
>6 Tage (n = 6)	2	2	2	-	2	2	2	2	-

Vergleicht man die Infektionstage zwei und sechs miteinander (siehe Abbildung 10) läßt sich ein Wechsel erkennen. Am zweiten Infektionstag dominierten die Proteinasen *SAP1* und *SAP6*. *SAP8* und *SAP9* wurden in der frühen Infektionsphase hingegen weniger exprimiert. Am sechsten Infektionstag sah das Expressionsmuster homogener aus. Die Proteinasen *SAP4*, *SAP8* und *SAP9* waren hinzugekommen.

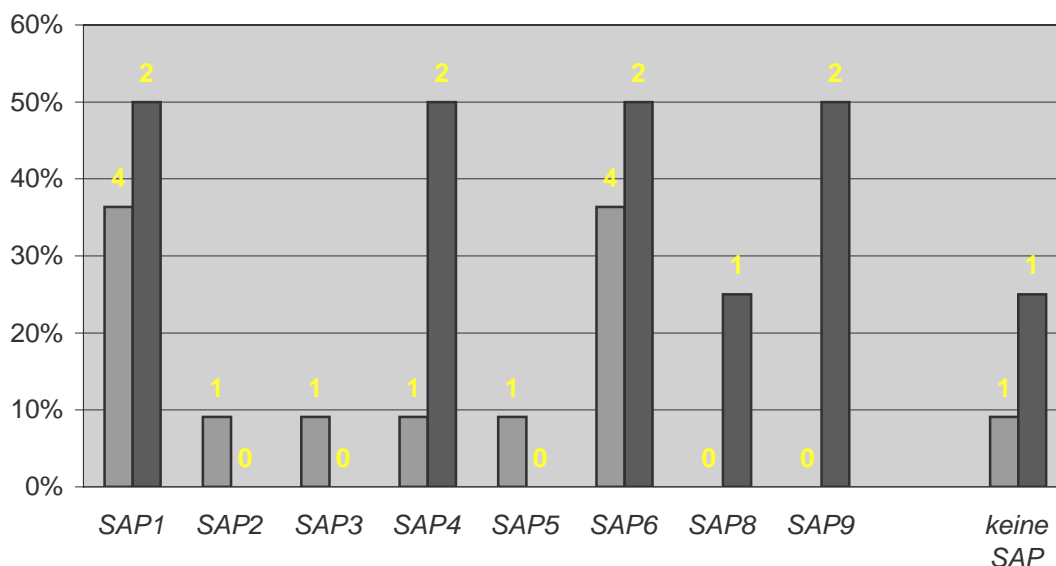


Abbildung 10: Vergleich der relativen Häufigkeit der SAP-Expression bei Patientinnen mit 2-tägiger (graue Balken, n = 11) und 6-tägiger Beschwerdeanamnese (schwarze Balken, n = 4). Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

Dennoch ist es schwer, den Infektionsphasen einzelne *SAPs* zuzuordnen. So waren z. B. *SAP8* und *SAP9* auch bei Patientinnen mit eintägiger Beschwerdeanamnese zu finden. Zu beachten ist, dass es sich in der Regel nicht um Neuinfektionen handelte, sondern um Patientinnen, bei denen durch eine Änderung des vaginalen Milieus eine Kolonisation zu einer symptomatischen Infektion wurde (siehe Diskussion).

Die Verteilung der einzelnen *SAPs* war nach 6-tägiger Beschwerdeanamnese (siehe Abbildung 10) ausgeglichener. Die *SAP2* könnte eine Proteinase der frühen Infektion sein, ansonsten fanden sich die verschiedenen *SAPs* in ausgewogenen Häufigkeiten. Möglicherweise benötigt der Pilz in der frühen Infektion gewisse Proteinasen um sein Milieu zu schaffen und kommt dann in eine Art Gleichgewicht.

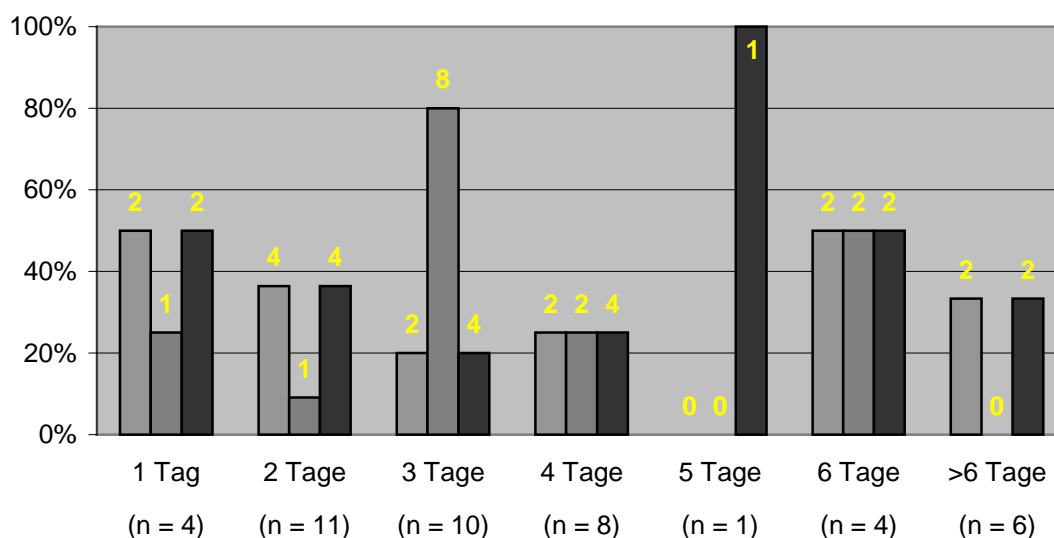


Abbildung 11: Relative Häufigkeit der Expression von *SAP1* (hellgraue Balken), *SAP4* (dunkelgraue Balken) und *SAP6* (schwarze Balken) in Abhängigkeit von der Beschwerdedauer. Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

Für das Proteinasegen *SAP4* ließen sich starke Expressionsschwankungen zeigen (siehe Abbildung 11). Am dritten Tag nach Beginn der Beschwerden zeigte *SAP4* deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zu den davor und danach liegenden Tagen. *SAP1* und *SAP6* wiesen hingegen homogene Verteilungsmuster auf. Sowohl *SAP1* als auch *SAP6* schienen keinen eindeutigen Höhepunkt ihrer Aktivität zu entwickeln. Sie wurden bereits am ersten Tag sezerniert und waren auch bei Patientinnen nachweisbar, die seit mehreren Wochen Beschwerden hatten.

3.3.2.4 SAP-Expression in Abhängigkeit stattgehabter Therapien

Aufgrund zu geringer Fallzahlen ließen sich im Hinblick auf stattgehabte Therapien keine signifikanten Aussagen machen. Die akut erkrankten Patientinnen hatten in den wenigsten Fällen vor ihrer Vorstellung beim Frauenarzt eine antimykotische Therapie begonnen. Lediglich 7 Patientinnen hatten in einem Zeitraum von bis zu 2 Monate vor Probenentnahme eine lokale antimykotische Therapie angewendet. Bei der Analyse dieser sieben Patientinnen fand sich eine Besonderheit. Es fällt auf, dass bei Patientinnen, bei denen die Therapie weniger als drei Tage zurücklag eine höhere Anzahl verschiedener SAPs exprimiert waren, als bei Patientinnen, bei denen die Therapie länger als vier Tage oder länger als eine Woche zurücklag (siehe Tabelle 8). Möglicherweise reagiert der Pilz auf seine Bekämpfung mit einer gesteigerten und nicht an die Umwelteinflüsse adaptierten SAP-Produktion.

Tabelle 8: Einfluß stattgehabter Therapien auf die Mehrfachexpression

Zeit seit Therapiebeginn	Fallzahl	Anzahl der gleichzeitig exprimierten SAPs (Median)
1-3 Tage	n = 2	5
4-7 Tage	n = 3	3
>7 Tage bis 2 Monate	n = 2	1

Der Eindruck, dass die SAP-Produktion nicht mehr gezielt gesteuert wird, bestärkt sich beim Betrachten des SAP-Expressionsusters der beiden Patientinnen, die innerhalb des Zeitraums von 1 bis 3 Tagen eine lokale Therapie angewendet hatten (siehe Tabelle 9):

Tabelle 9: Aufschlüsselung der einzelnen SAPs, die nach kurzfristig vor Probenentnahme stattgehabter Therapie gebildet wurden.

Probennummer	Medikament	Zeit zwischen Behandlung und Probennahme	SAP1	SAP2	SAP3	SAP4	SAP5	SAP6	SAP8	SAP9
70	Clotrimazol	2 Tage	+	-	+	+	-	+	+	+
106	Fluconazol	1 Tag	+	+	+	-	-	+	+	+

Um diese Vermutung zu erhärten wären selbstverständlich neue Untersuchungen mit höheren Fallzahlen von Nöten.

Zwei Patientinnen hatten bei Beschwerdebeginn eine lokale Yoghurttherapie begonnen. Beide berichteten über eine Beschwerdebesserung (möglicherweise Kühlungseffekte). In beiden Fällen ließ sich die ansonsten nur selten exprimierte (11%) *SAP2* nachweisen.

3.3.2.5 *SAP-Expression in Abhängigkeit von der Infektionshäufigkeit pro Jahr*

Es wurden Proben von Patientinnen untersucht, die bis zu einschließlich vier Infektions-episoden im vorangegangenen Jahr hatten. Wir wollten untersuchen, ob sich bei der *SAP*-Expression Unterschiede feststellen lassen zwischen Patientinnen, die ihre erste Infektion haben und solchen, die mindestens eine Infektion pro Jahr haben.

Tabelle 10: *SAP*-Expression in Relation zur Infektionshäufigkeit

Infektionen pro Jahr	Fallzahl	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>	keine <i>SAP</i> -Expression
0	n = 15	5	2	1	3	1	3	3	-	4
1	n = 9	3	-	1	4	-	3	1	1	1
2	n = 10	3	1	2	3	1	5	1	3	1
3	n = 5	1	-	1	4	2	1	1	2	-
4	n = 4	-	1	-	1	1	2	1	3	-

Bei der Betrachtung von Tabelle 10 fällt auf, dass bei 4 von 15 Patientinnen (27%), die ihre erste Infektion hatten, keine *SAP*-Expression nachweisbar war. Bei Patientinnen mit einer stattgehabten Infektion im letzten Jahr war dies bei einer von neun (11%), bei Patientinnen mit zwei stattgehabten Infektionen im letzten Jahr bei einer von 10 Proben (10%) der Fall. Unter den Proben von Patientinnen mit drei oder vier Infektionen pro Jahr war keine ohne *SAP*-Expression. *SAP1* fand sich gehäuft bei Patientinnen mit keiner (33%), einer (33%) und zwei (30%) Infektionen im letzten Jahr.

Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch das Vorkommen von *SAP9*. Diese fand sich bei 75% der Patientinnen mit vier Infektionsepisoden im letzten Jahr, ist aber bei Frauen, die ihre erste Infektion durchleben, nicht zu finden. *SAP4* und *SAP6* sind Proteinasen, deren Expression anscheinend von vorangegangenen Infektionen nicht beeinflusst wird.

Tabelle 11: Einfluß der Infektionshäufigkeit auf die Mehrfachexpression

Infektionen pro Jahr	Fallzahl	Anzahl der gleichzeitig exprimierten SAPs (Durchschnitt)
0	n = 15	1,1
1	n = 9	1,4
2	n = 10	1,9
3	n = 5	2,4
4	n = 4	2,3

Analysiert man Tabelle 11, so zeigt sich eine stetige Zunahme der SAP-Mehrfachexpressionen mit der Häufigkeit der Infektionen im letzten Jahr. Dies läßt sich zum Teil mit dem gehäuften Vorkommen von Proben ohne SAP-Expression im Patientenkollektiv der Frauen mit weniger als zwei Infektionen pro Jahr erklären, ist aber dennoch ein Phänomen, dem Beachtung geschenkt werden sollte.

3.3.3 Asymptomatische Patientengruppe (Kontrollgruppen)

Um Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob die Proteinase der SAP-Familie daran beteiligt sind, wenn aus einer Kolonisation der Vagina eine symptomatische Vaginalkandidose entsteht, wurden Proben von beschwerdefreien Patientinnen entnommen, die im letzten Jahr keine Beschwerden im Sinne einer symptomatische Vaginalkandidose beklagt hatten (Kontrollgruppe I). Diese Proben wurden in der gleichen Weise wie die der symptomatischen Patientinnen ausgewertet. Es gelang ein RNA-Nachweis bei 26 von 37 Patientinnen.

Zur Ermittlung der Spezifität der rT-PCR bei *in vivo*-Analysen wurde eine zweite Kontrollgruppe gebildet. Hier war das Ziel, Proben von Patientinnen zu analysieren, die keine *C. albicans*-Organismen im Vaginalsekret haben. Um dies zu erreichen wurden die Proben von postmenopausalen Frauen verwendet, da diese üblicherweise so gut wie nie an Vaginalkandidosen leiden (Kontrollgruppe II).

3.3.3.1 Kontrollgruppe I

Tabelle 12: Untersuchte Proben asymptomatischer Trägerinnen, bei Schwangeren Angabe der Schwangerschaftswoche (SSW); n.a.: nicht analysiert

Probennummer	Kulturergebnis	Expressionsnachweis mit rT-PCR									SSW
		<i>EFBI</i>	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>	
73	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
74	negativ	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
75	negativ	+	-	-	-	+	+	-	-	-	
76	negativ	+	-	-	-	-	-	-	+	+	35+0
77	negativ	-	-	-	+	+	-	-	+	-	
78	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
79	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
80	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
81	negativ	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
86	<i>C. albicans</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	
87	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
88	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
89	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
90	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
95	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
96	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
97	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
98	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
99	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
115	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
116	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
117	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
118	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
119	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30+0
121	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
122	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	29+0
123	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
124	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	28+5
125	negativ	-	-	+	+	-	+	+	-	-	33+5
133	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	38+0
138	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	26+0
139	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26+0
149	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	14+0
150	negativ	+	+	-	-	+	-	-	+	-	37+3
151	negativ	-	+	-	-	-	-	-	-	-	16+0
152	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30+2
163	negativ	+	+	-	+	-	+	-	-	-	25+1
164	n.a.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17+0
165	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35+0
166	<i>C. albicans</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
167	negativ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Summe:		20	4	1	4	3	3	4	4	3	

Das *SAP*-Verteilungsmuster ergibt sich aus Abbildung 12:

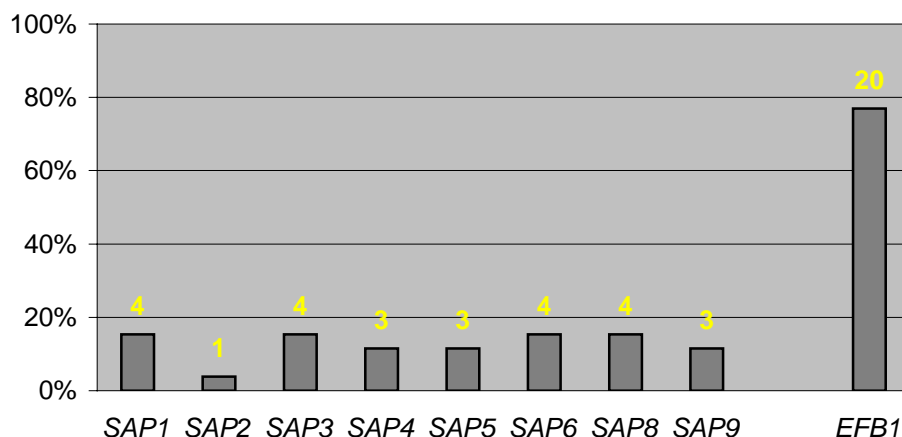


Abbildung 12: Relative Häufigkeit der *SAP*- und *EFB1*-Expression bei asymptomatischen Patientinnen (n = 26). Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

Unter Beachtung der geringeren Fallzahlen fällt dennoch insgesamt ein homogeneres Verteilungsmuster auf. Es gab keine *SAP*-Proteinase, die aufgrund ihrer Häufigkeit hervortrat. Auffällig ist, dass *SAP3* (15% der Proben) und *SAP8* (15% der Proben) zahlreich vorhanden waren, wohingegen *SAP2* (4% der Proben) und *SAP9* (12% der Proben) seltener exprimiert wurden. Es gab ebenfalls weniger Fälle von Mehrfachexpression (siehe Abbildung 13).

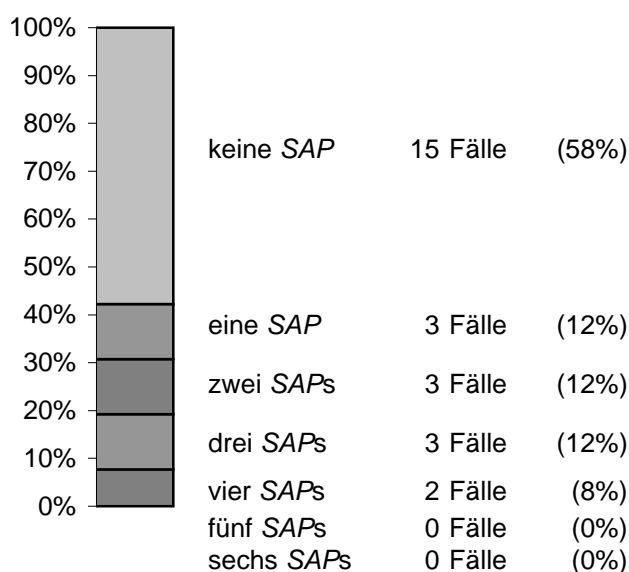


Abbildung 13: Aufschlüsselung der Häufigkeit von *SAP*-Mehrfachexpressionen bei asymptomatischen Patientinnen (n = 26).

Betrachtet man die Zahl der miteinander kombinierten *SAPs* (siehe Tabelle 13), so fällt auf, dass es keine Häufigkeit von Kombinationsanzahlen gab. Es dominierten die *Candida*-Stämme ohne *SAP*-Expression. Die Stämme, die eine *SAP*-Expression aufwiesen, exprimierten in der Regel 1 bis 3 *SAPs* miteinander.

Tabelle 13: Kombinationsmuster der *SAP*-Expressionen bei asymptomatischen Patientinnen

	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	Koexpression mit						alleinige Proteinase
			<i>SAP3</i>	<i>SAP4</i>	<i>SAP5</i>	<i>SAP6</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>	
<i>SAP1</i>	X	0	1	1	1	0	1	0	1
<i>SAP2</i>	0	X	1	0	1	1	0	0	0
<i>SAP3</i>	2	1	X	1	2	2	2	0	0
<i>SAP4</i>	1	0	1	X	1	0	2	0	0
<i>SAP5</i>	1	1	2	1	X	1	0	0	0
<i>SAP6</i>	0	1	2	0	1	X	1	1	1
<i>SAP8</i>	1	0	2	2	0	1	X	1	0
<i>SAP9</i>	0	0	0	0	0	1	1	X	1
Koexpression	5	3	9	5	6	6	7	2	

Unter Beachtung der geringeren Fallzahlen läßt sich aus Tabelle 13 keine konkrete Aussage ableiten. Insgesamt war die Verteilung der *SAP*-Kombinationen sehr homogen. Es bildeten sich keine klaren Paare heraus. Hier ist zu erwähnen, dass *SAP3* ein Proteinasegen war, das immer mit mindestens zwei anderen Proteinasegen kombiniert auftrat. *SAP9* hingegen war alleine oder höchstens in Kombination mit einer weiteren Proteinase zu finden.

Die Proben 76, 125, 150, 151 und 163 stammten von schwangeren Frauen. *SAP1* fand sich bei 3 der Frauen (60%) und ist damit die einzige Proteinase, die eine besondere Rolle im Vaginalmilieu der Schwangeren spielen könnte. Von den 15 Proben ohne *SAP*-Expression stammten 5 Proben von schwangeren Frauen.

Auffallend ist, dass die beiden Proben mit vier verschiedenen nachweisbaren *SAPs* (Probe 86 und 125) von Patientinnen stammen, die an einer bakteriellen Infektion litten; im Fall von Probe 86 an einer Bartholinitis, bei Probe 125 an einer Ureaplasmen-Infektion des Genitale. Möglicherweise ist die vielfältigere *SAP*-Expression eine Antwort auf die lokale Entzündungsreaktion, deren Ursache nicht bei der Pilzbesiedelung, sondern bei einer wie auch immer gearteten bakteriellen oder parasitären Infektion zu suchen ist.

3.3.3.2 Kontrollgruppe II

In dieser Gruppe wurden die Proben von fünf postmenopausalen Frauen (Proben Nr. 24, 32, 57, 66 und 72) ausgewertet, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme keinerlei Beschwerden im Sinne einer Vulvovaginalkandidose hatten. Alle fünf Proben waren kultur-negativ, ebenso gelang kein Nachweis von *Candida*-RNA.

3.3.4 Vergleich Schwangere versus Nicht-Schwangere

Beim Vergleich der *SAP*-Expression bei schwangeren und nicht-schwangeren Patienten konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 14). Insgesamt erscheint das Expressionsmuster in beiden Probengruppen sehr gleichmäßig. Lediglich *SAP1* ließ sich etwas häufiger bei Schwangeren nachweisen (15% gegenüber 6%). Wegen der geringen Fallzahlen ist dieses Ergebnis jedoch mit Vorsicht zu betrachten.

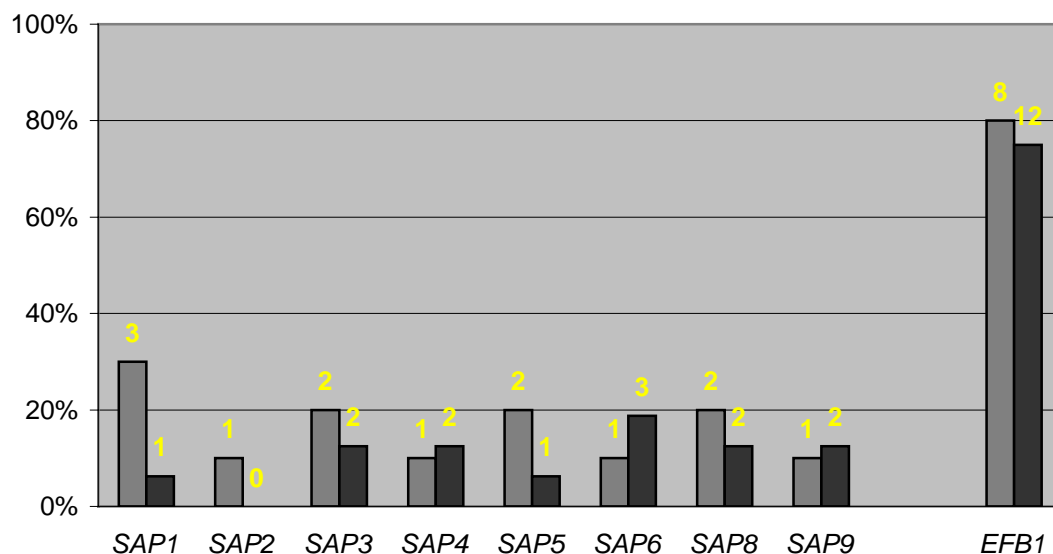


Abbildung 14: Vergleich der relativen Häufigkeit der *SAP*- und *EFB1*-Expression bei schwangeren (graue Balken, n = 10) und nicht-schwangeren Patientinnen (schwarze Balken, n = 16) in der Kontrollgruppe I. Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

Vergleicht man die Expressionsdaten unter Ausschluss der Proben, bei denen sich kein *EFB1*-Signal nachweisen ließ, so zeigt sich in etwa das gleiche Bild (siehe Abbildung 15). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die *SAP*-Signale bei den *EFB1*-negativen

Proben sehr wahrscheinlich nicht durch Kontaminationen hervorgerufen wurden, sondern auf *Candida*-RNA zurückzuführen waren.

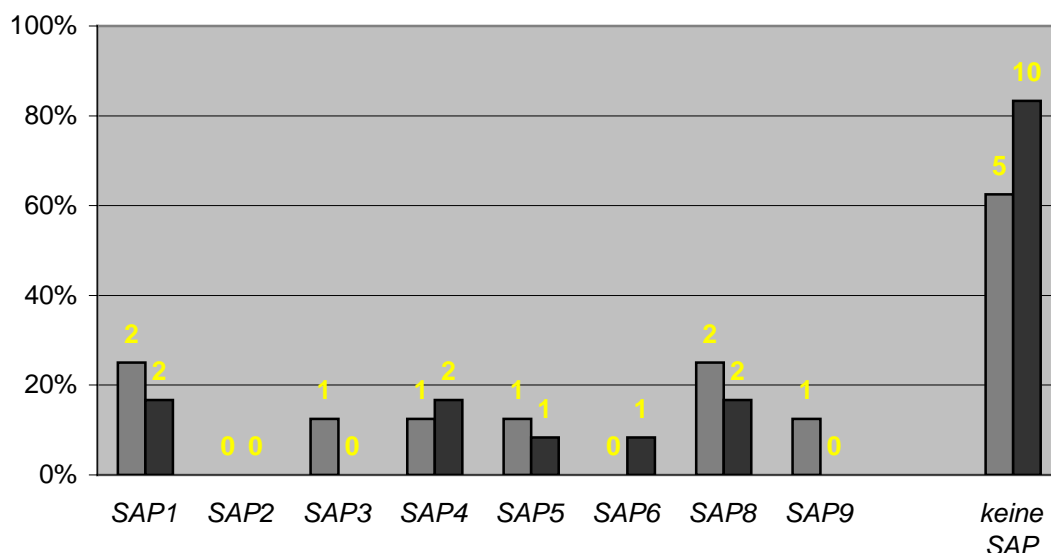


Abbildung 15: Vergleich der relativen Häufigkeit der *SAP*-Expression zwischen schwangeren (graue Balken, n = 8) und nicht-schwangeren (schwarze Balken, n = 12). Patientinnen bei den Proben, in denen *EFBI*-Expression nachgewiesen werden konnte. Oberhalb der Balken sind die absoluten Fallzahlen angegeben.

3.4 Statistische Auswertung

Die Unterschiede in der relativen Häufigkeit der *SAP*-Expression zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten wurden auf ihre Signifikanz hin analysiert. Dabei wurde der Chi-Quadrat-Test für den Vergleich unabhängiger Stichproben in 4-Felder-Tafeln nach folgender Formel verwendet:

$$p = \frac{N \times (|A \times D - B \times C| - N / 2)^2}{(A + B) \times (C + D) \times (A + C) \times (B + D)}$$

Bei einigen Berechnungen lagen ein oder mehrere Erwartungswerte unter 5 (diese Situation trat ein bei *SAP2*, *SAP3*, *SAP5*, *SAP8* und *SAP9*). In diesen Fällen kam der Fisher-Test ("Fisher's exact probability test") nach folgender Formel zur Anwendung:

$$p = \frac{2 \times (A + B)! \times (C + D)! \times (A + C)! \times (B + D)!}{N! \times A! \times B! \times C! \times D!}$$

Das alpha-Niveau wurde dabei auf 0,05 festgelegt. Im Bezug auf unabhängige Variablen waren die Gruppe der symptomatischen und asymptomatischen Patientinnen homogen. Lediglich in der Kontrollgruppe (asymptomatische Patientinnen) fanden sich deutlich häufiger Schwangere. Es ergeben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren im Bezug auf die *SAP*-Expression (siehe Abschnitt 3.3.4). Zu beachten ist hier jedoch die geringe Fallzahl. Eingehendere Untersuchungen im Bezug auf das Merkmal Schwangerschaft sollten folgen.

Es ergaben sich folgende p-Werte:

<i>SAP1</i> :	$p > 0,1$	(Chi-Quadrat-Test)	nicht signifikant
<i>SAP2</i> :	$p = 0,56$	(Fisher-Test)	nicht signifikant
<i>SAP3</i> :	$p = 1,45$	(Fisher-Test)	nicht signifikant
<i>SAP4</i> :	$p > 0,05$	(Chi-Quadrat-Test)	nicht signifikant
<i>SAP5</i> :	$p = 1,36$	(Fisher-Test)	nicht signifikant
<i>SAP6</i> :	$p > 0,10$	(Chi-Quadrat-Test)	nicht signifikant
<i>SAP8</i> :	$p = 1,37$	(Fisher-Test)	nicht signifikant
<i>SAP9</i> :	$p = 0,14$	(Fisher-Test)	nicht signifikant
<i>Candida</i> -Stämme ohne <i>SAP</i> -Expression:	$p < 0,001$	(Chi-Quadrat-Test)	hoch signifikant
<i>SAP4-6</i> zu einer Gruppe zusammengefasst:	$p < 0,05$	(Chi-Quadrat-Test)	signifikant

Unter Zuhilfenahme der Vierfeldertafeln konnten somit im Wesentlichen zwei signifikante Unterschiede zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patientinnen herausgearbeitet werden. Zum einen überwogen bei den asymptomatischen Frauen verglichen mit symptomatischen Frauen *Candida*-Stämme, die zur Zeit der Probenentnahme keine *SAP*-Expression aufwiesen. Dieser Unterschied ist hoch signifikant. Desweiteren unterschied sich die Expression der funktionell verwandten Proteinasen *SAP4-6* ebenfalls signifikant wenn man sie als Gruppe betrachtet und alle Proben in die Auswertung miteinbezieht, die mindestens eine dieser Proteinasen exprimierte.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifikation eines für die Vaginalinfektion typischen Expressionsmusters der Genfamilie der sekretorischen Aspartylproteinasen von *Candida albicans*. Dazu wurde RNA aus Patientinnenproben isoliert und mittels rT-PCR die Expression der Proteinase dargestellt. In dieser Studie wurde eine zweckmäßige, verlässliche und hoch spezifische Methode zum *in vivo*-Nachweis von *C. albicans* SAP mRNA bei Vulvovaginalkandidosen etabliert. Die Methode wurde bisher bei Infektionsmodellen mit künstlicher Epidermis eingesetzt. Bei neun Proben, die kulturnegativ waren, ließ sich *C. albicans* RNA nachweisen. Diese Beobachtung deutet lediglich das Potential an Sensitivität an, das eine auf dem Nachweis von Nukleinsäuren beruhende Methode mit sich bringt. Allerdings ließ sich trotz positivem kulturellem Nachweis bei 50 Proben in nur 32 Fällen auch *Candida*-RNA finden. Hieraus läßt sich ablesen, wie störanfällig eine Methode ist, die wie die rT-PCR auf Isolation von RNA beruht. Dies hängt wohl mit der Fragilität des RNA-Moleküls zusammen, das sehr empfindlich gegen Temperaturwechsel und Kontamination mit RNA-verdauenden Enzymen ist. Der relativ hohe Anteil an falsch-negativen rT-PCR Ergebnissen wird seine Ursache zu einem nicht unbeachtlichen Teil an der Arbeit mit *in vivo*-Proben haben. Bei der Bearbeitung von Patientenproben ist mit Sicherheit mit einer höheren Konzentration an RNA-verdauenden Enzymen und Hemmstoffen zu rechnen, als bei der Arbeit mit reinen Kulturen. Welche Stoffe dies sind, und inwieweit diese Stoffe nach der Phenol-Chloroform-Extraktion und den diversen Waschschritten noch in der Lösung sind, kann nicht gesagt werden.

Mit Hilfe spezifischer Primer für die Proteinasegene *SAP1-6* und *SAP8-9* konnte gezeigt werden, dass alle acht Proteinase *in vivo* exprimiert werden. Es wurden 132 Proben symptomatischer Patientinnen ausgewertet, wobei bei 45 Patientinnen ein RNA-Nachweis gelang. Hier dominierten die Proteinase *SAP1*, *SAP4* und *SAP6*. Insgesamt konnte für die *SAP*-Expression ein heterogenes Muster dokumentiert werden. Dies steht im Gegensatz zu Arbeiten, die teilweise eindeutige Unterschiede der *SAP*-Expression erbracht hatten. In der vorliegenden Arbeit konnte keine im vaginalen Milieu dominierende Proteinase entdeckt werden. Es liegt lediglich eine Häufung von *SAP1*, *SAP4* und *SAP6* vor. Vergleicht man diese Resultate mit Ergebnissen aus Versuchen mit Mutanten, denen bestimmte *SAP*-Gene fehlen, erscheint das Dominieren der drei *SAPs* als verständlich.

De Bernardis et al. (1999) konnten in einem Vaginitismodell der Ratte mit Hilfe von Stämmen mit fehlender *SAP1-3* die Wichtigkeit von *SAP1-3* für die Infektion zeigen. *SAP1* und *SAP3* wird ein Zusammenhang mit dem "phenotypic switching" des Pilzes nachgesagt (Morrow, 1992; Hube, 1994; Morrow, 1994; White, 1995). Sowohl bei der symptomatischen Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe zeigten sich hohe *SAP1*- und *SAP3*-Werte, so dass man annehmen kann, dass der Wechsel des Phänotypes ein für Besiedlung und Infektion wichtiger Virulenzfaktor ist. Diese Beobachtung bei Patientinnen mit vaginaler Infektion und Besiedlung entspricht nicht den Beobachtungen von Naglik et al. (1999) bei oraler Infektion und Besiedlung. Naglik et al. (1999) konnten für Patienten mit oraler Kandidose *SAP1* und *SAP3* nachweisen, bei kolonisierten Patienten gelang ihnen dies nicht. Hier besteht möglicherweise ein Unterschied zwischen vaginalem und oralem Milieu. Bei derartigen Mutmaßungen muss allerdings die geringe Fallzahl von Naglik et al. (1999; 8 kolonisierte und 10 Patienten mit oraler Kandidose) Beachtung finden.

In einer späteren Arbeit konnten Naglik und Mitarbeiter (2003) diesen Unterschied weiter belegen. Sie werteten Proben von Patienten mit oraler und vaginaler Kandidose aus und fanden bei der vaginalen Kandidose *SAP1*, 2, 3, 5 und 8 als die häufigsten Proteinase (bei der oralen Kandidose zusätzlich *SAP4* und *SAP7*). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit nahmen Naglik et al. (2003) keine Differenzierung zwischen akuter und chronisch rezidivierender Kandidose vor. Die hohe Wertigkeit der *SAP5* ist wohl der Hauptunterschied zwischen der Arbeit von Naglik et al. (2003) und der vorliegenden Arbeit. Über die Gruppe der *SAP4-6* ist aber zu wenig bekannt, um dieses Ergebnis genau interpretieren zu können. Von der Funktion her ist die Proteinasegruppe der *SAP4-6* sicher in einem ähnlichen Bereich, dem "phänotypic switching", anzusiedeln.

Dass Unterschiede zwischen den Proteinase bestehen, konnten Chen et al. (2002) näher beleuchten. Sie zeigten, dass die *SAP5* eine Proteinase ist, die der Pilz in der frühen Phase nach Induktion des Wechsels des Phänotypes und insbesondere bei neutralem pH-Wert sezerniert. Zieht man diese Information heran, verwundert es, dass Naglik et al. (2003) die *SAP5* so häufig im bekanntermaßen saueren Milieu der Vagina nachweisen konnten. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Dominanz der *SAP4* aus der Gruppe der *SAP4-6*, ist mit den Ergebnissen von Chen et al. (2002), die eine Expression von *SAP4* und *SAP6* im sauren Milieu beobachteten, gut zu vereinbaren.

Auch Schaller et al. (1999) konnten mit Hilfe *SAP*-defizienter Mutanten Aussagen zur Wichtigkeit der verschiedenen *SAPs* während der Infektion machen. In einem Modell

mit künstlicher Mundschleimhaut konnte gezeigt werden, dass *sap1-3* Mutanten wesentlich in Ihrer Virulenz beeinträchtigt waren, *sap4-6* Mutanten dagegen weniger. *sap1,3*-Doppelmutanten verursachten weniger Gewebeschäden, als Mutanten, denen entweder nur *SAP1* oder *SAP3* fehlten. Aus dieser Studie geht hervor, dass *SAP1* und *SAP3* nicht nur durch ihre Bedeutung während des "phenotypic switchings" einen Virulenzfaktor darstellen, was möglicherweise den Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen erklärt. Schaller et al. (1999) zeigen also, dass sich *SAP1* und *SAP3* in ihrer Wirkung addieren und nicht ersetzen. Dennoch war in der vorliegenden Arbeit der Prozentsatz an Patientinnen, die beide Proteinase gleichzeitig exprimieren auffällig gering, nämlich 4% bei den symptomatischen Frauen und 8% in der Kontrollgruppe. Interessanterweise hatten *SAP1* und *SAP3* auch unterschiedliche relative Häufigkeiten in den beiden Gruppen. Bei den symptomatischen Patientinnen wurde *SAP1* in 31% der Fälle (14 von 45 Proben) und *SAP3* in 13% der Fälle (6 von 45 Proben) exprimiert. In der Kontrollgruppe dominierte *SAP3* (15%) über *SAP1* (12%). Der Pilz scheint sein gewebeschädigendes Potential nicht immer voll auszuschöpfen, sondern hat durch die Veränderung des *SAP* mRNA-Expressionsmusters die Möglichkeit zur Feinregulation.

Für *SAP2* konnte im Ratten-Modell eine eindrucksvolle Relevanz für das Aufrechterhalten einer vaginalen Infektion gezeigt werden (De Bernardis,1999). Diese Beobachtung kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. *SAP2* war nur bei 11% der symptomatischen Patientinnen und 4% der Kontrollpatientinnen nachweisbar. Es scheint, dass das Rattenvagina-Modell nicht mit dem Milieu der menschlichen Scheide verglichen werden kann. Mit Hilfe des Fisher-Testes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patientinnen bezüglich der Proteinase *SAP2* herausgearbeitet werden. Nach diesen Ergebnissen ist die *SAP2* eher eine Proteinase der frühen Infektionsphase und nicht der etablierten Infektion.

Sanglard et al. (1997) äußerten die Vermutung, dass *SAP4-6* eine entscheidende Rolle bei der Induktion der *SAP2*-Expression spielen. Naglik et al. (1999) konnten durch ihre Ergebnisse diese Vermutung erhärten. Von Patienten mit oraler Kandidose konnten sie keine *SAP2*-Expression ohne gleichzeitige Expression von *SAP4*, 5 oder 6 nachweisen. Diese Resultate konnten für die vaginale Kandidose nicht reproduziert werden. *SAP2* war nur in 60% ihres Vorkommens mit *SAP4-6* kombiniert, wobei *SAP6* der häufigste Kombinationspartner war. Die Erklärung hierfür liegt möglicherweise in der Tatsache, dass *SAP4-6* die *SAP2*-Expression induzieren sollen, zeitlich also vor *SAP2* exprimiert werden, so dass man sich vorstellen kann, dass die Expression von *SAP4-6* bereits nicht mehr

nachweisbar ist, während die *SAP2*-Expression aber weiter besteht. Außer der Induktion der *SAP2*-Expression werden *SAP4-6* beim Wechsel von der Hefen- zur Hyphenform benötigt. Für Mutanten mit fehlender *SAP4*, *SAP5* oder *SAP6* Produktion konnte im Rattenmodell keine verringerte Virulenz für Schleimhautinfektionen nachgewiesen werden.

Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit *SAP4-6* als eine Gruppe und mittelt die einzelnen Prozentwerte, kommt man bei den symptomatischen Patientinnen auf eine *SAP4-6* Beteiligung von 26%, bei der Kontrollgruppe auf einen Wert von 28%. Zu einer Gruppe zusammengefasst bestehen zwischen infizierten und kolonisierten Patientinnen also in Bezug auf *SAP4-6* kaum Unterschiede. Betrachtet man die *SAPs* aber isoliert, fällt auf, dass die kolonisierten Patientinnen ausgewogene Anteile von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* aufweisen, die symptomatische Gruppe allerdings um den Faktor 3 höhere Anteile an *SAP4* und *SAP6* verglichen mit *SAP5* hat. Bekanntermaßen ist *Sap5* eine Proteinase, die in den ersten 6 Stunden nach dem "phaenotypic switching" gebildet wird. Offensichtlich liegen bei symptomatischen Patientinnen der Großteil der Pilzorganismen in der gewebsinvasiven Form, der Hyphenform, vor, so dass deutlich weniger Wechsel stattfinden und *SAP5* aus diesem Grund seltener gefunden wird, als *SAP4* und *SAP6*, die erst 24 Stunden nach dem Wechsel des Phänotyps ihr Sekretionsmaximum erreichen (Chen, 2002).

Ebenfalls interessant ist die Beobachtung, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht, wenn man die Proteinase zusammengefasst betrachtet. Dabei wird jede Probe gezählt, die mindestens eine der drei Proteinasegene *SAP4*, *SAP5* oder *SAP6* exprimiert. So betrachtet finden sich bei den symptomatischen Patienten signifikant häufiger eine der drei Proteinase oder eine Kombination aus den Dreien. Das "phänotypic switching", als bisher bekannte Hauptfunktion der *SAP4-6* ist somit ein wesentlicher Teil bei der Entwicklung einer Infektion aus einer asymptomatischen Kolonialisierung.

Für *SAP8* sind keine Charakteristika beschrieben. Monod (1998) konnte zeigen, dass die *SAP8*-Expression temperaturabhängig ist. Uns fiel auf, dass die *SAP8* bei kolonisierten Patientinnen häufiger exprimiert wird, als bei akut erkrankten (33% gegenüber 19%). Ebenfalls auffällig war, dass sich *SAP8* ähnlich wie *SAP9* verhält, wenn man die *SAP*-Expression vor dem Hintergrund der Beschwerdedauer betrachtet. So konnten *SAP8* und *SAP9* bei Patientinnen, die seit 2 Tagen unter Beschwerden litten nicht nachgewiesen werden, waren aber bei Frauen, die seit sechs Tagen über kandidosetypische Beschwerden klagten, in 10% bzw. 20% der Fälle vorhanden. Möglicherweise ist *Sap8* auch eine

Proteinase, die nach längerer Infektionsdauer gebildet wird und dem Pilz weniger bei der Invasion, sondern vielmehr bei der Aufrechterhaltung des Milieus dienlich ist. Dies würde auch das gehäufte Vorkommen bei kolonisierten Patientinnen erklären.

Sap9 ist durch seine Aminosäuresequenz als Bestandteil der Zellwand identifiziert worden. *SAP9*-Expression konnte bei 22% der Patientinnen nachgewiesen werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, in der die *SAP9* mit 12% vertreten war. *SAP9* war sowohl in der Gruppe der symptomatischen Patientinnen, als auch in der Kontrollgruppe häufig mit *SAP4* und *SAP6* gleichzeitig exprimiert. *SAP9* wird erst im späteren Infektionsverlauf exprimiert. Interessant war die Beobachtung, dass *SAP9* gehäuft bei Patientinnen gefunden wurde, die im letzten Jahr bereits drei oder vier Infektionen gehabt hatten. Aus dieser Tatsache kann man ableiten, dass Sap9 eine Proteinase ist, die bei kolonisierten Patientinnen für ein hohes Kandidosereizdivrisiko mitverantwortlich ist. Schließlich findet sie sich bei kolonisierten Patientinnen, die keine Vaginalkandidose in der Anamnese aufweisen, nicht gehäuft.

Das Vorhandensein sekretorischer Proteinasen als Virulenzfaktor ließ sich auch durch unsere Daten eindrucksvoll darstellen. Mit zunehmender Zahl von Infektionsepisoden steigt auch die Zahl der exprimierten *SAPs*. Waren es bei Patientinnen, die keine Infektion im Vorjahr gehabt hatten 1,1 *SAPs*, die gleichzeitig exprimiert wurden, so waren es bei Patientinnen mit vier Infektionsepisoden 2,3. Diese Beobachtung belegt erstens die Wichtigkeit der *SAPs* für die Infektion und zweitens die klinische Beobachtung, dass *C. albicans* im Bezug auf die Virulenz nicht gleich *C. albicans* ist.

Die Beobachtung, dass die Expression verschiedener *SAPs* bei Patientinnen, die kurz zuvor antimykotische Medikationen verwendet hatten, höher lag als sonst (sechs verschiedene *SAPs* 1-3 Tage nach Therapie) lässt sich durch zwei Hypothesen erklären. Erstens scheint der Pilz auf seine Bekämpfung mit einer nicht adaptierten *SAP*-Produktion zu reagieren, zweitens findet durch die oftmals unzureichende Therapie eine Selektion von virulenten *C. albicans* Stämmen statt, die höhere *SAP*-Produktionen aufweisen. Die Beobachtung, dass virulentere *Candida*-Stämme eine gesteigerte *SAP*-Expression aufweisen wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die *SAP*-Mehrfachexpression mit der Infektionshäufigkeit pro Jahr zunimmt. Findet sich bei Patientinnen, die ihre erste Infektion durchleben noch ein hoher Prozentsatz an *Candida*-Stämmen ohne *SAP*-Expression, so findet sich bei Patientinnen mit mehr als 2 Infektionen im letzten Jahr keine Probe ohne *SAP*-Expression. Im Gegenteil, die Anzahl der gleichzeitig exprimierten *SAPs* steigt mit der Anzahl durchlebter Infektionen im letzten Jahr an.

In der Kontrollgruppe fielen verglichen mit den anderen Proben zwei Proben auf, die vier verschiedene *SAPs* exprimiert hatten. In der Anamnese dieser Patientinnen fand sich eine bakterielle Infektion (Bartholinitis und Ureaplasmen-Infektion). Eine Erklärung für die Mehrfachexpression könnte sein, dass der Pilz mit der gesteigerten *SAP*-Vielfalt auf eine Entzündungsreaktion des Körpers reagiert, die er nicht selber hervorgerufen hat, sondern die auf die bakterielle Infektion zurückgeht. Diese Hypothese müsste mit weiteren Untersuchungen gestützt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass es nach den vorliegenden Daten keine bei Vaginalkandidosen dominierende Proteinase bei *C. albicans* gibt, sondern vielmehr das Zusammenwirken der *SAPs* die Potenz des Virulenzfaktors Aspartylproteinase ausmacht.

Der Unterschied der vorliegenden *in vivo*-Daten im Vergleich zu *in vitro*-Analysen geht auf mehrer Punkte zurück. Bei *in vivo*-Datenerhebungen gibt es eine Vielzahl an Variablen (Immunantwort des Wirtes, Unterschiede der Scheidenflora, usw.) die auf die *SAP*-Expression Einfluss nehmen. Durch diese Tatsache lässt sich das heterogene Verteilungsmuster der *SAPs* erklären. Eine Vergleichbarkeit mit *in vitro*-Analysen ist aus diesem Grund nur begrenzt gegeben. Als Kritikpunkt dieser Arbeit muss das häufige Fehlen von *EFBI*-Signalen angesehen werden. Bei Proben ohne *EFBI*-Signal ist die Auswertung der *SAP*-Signale als problematisch anzusehen. Vergleicht man die Proben, bei denen *SAP*-Signale nur in Kombination mit *EFBI*-Signalen vorkamen mit der Gesamtheit der Proben, so findet sich jedoch kein Unterschied im Bezug auf das insgesamt heterogene Bild. Dennoch ist hier eine Einschränkung gegeben und möglicherweise eine weitere Erklärung für die Diskrepanz der vorliegenden Daten im Vergleich zu *in vitro*-Analysen.

5 Zusammenfassung

Das extrazelluläre proteolytische Potential von *Candida albicans* geht auf die Aktivität von mindestens zehn sekretorischen Aspartylproteinasen (SAPs) zurück. Obwohl die Substratspezifität der SAPs sehr ähnlich zu sein scheint, unterscheiden sie sich in ihren pH-Optima, der Temperaturstabilität und in ihrem Expressionsmustern. *C. albicans* verfügt damit über eine Genfamilie, deren exakt regulierte Expression dem Pilz ermöglicht, an verschiedenen Oberflächen zu haften, dem Immunsystem des Wirtes zu trotzen und in tiefere Gewebsschichten zu penetrieren. In einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass durch das selektive Ausschalten eines einzigen Genes, *SAP2*, ein Stamm erzeugt werden konnte, der in der vaginalen Infektion keine bedeutende Virulenz mehr besaß. Solche Ergebnisse ermutigen dazu, SAP-Inhibitoren als potenten Therapieansatz zu favorisieren, jedoch muß vorher geklärt werden, welche SAPs bei Vaginalkandidosen *in vivo* exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 174 Patientenproben mittels rT-PCR auf *SAP*-Expression hin untersucht, 132 von symptomatischen und 42 von asymptomatischen Patientinnen. Auffällig war ein hochsignifikanter Unterschied zwischen symptomatischer Infektion und asymptomatischer Kolonisation bezüglich *Candida*-Stämmen, bei denen keine *SAP*-Expression nachweisbar war. Bei symptomatischen Frauen fanden sich deutlich weniger *Candida*-Stämme, deren *SAP*-Expression zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter der Nachweisgrenze lag. Es liegt somit nahe, dass die *SAP*-Proteinase ein wesentlicher Virulenzfaktor sind, deren Hochregulation im Infektionsverlauf unabdingbar ist. Dennoch konnte auch bei einem Teil der Kontrollgruppenproben *SAP*-Expression nachgewiesen werden. Insgesamt waren die Proteinasegene *SAP1*, *SAP4* und *SAP6* am häufigsten exprimiert. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit dem bisherigen Wissen über *SAPs* in Einklang bringen. *SAP1* konnte in vielen *in vitro*-Modellen als wichtiger Virulenzfaktor herausgearbeitet werden. *SAP4-6* sind Proteinase, die im Zusammenhang mit der Hyphen-Formation gebildet werden, wobei *SAP4* und *SAP6* bevorzugt im sauren Milieu gebildet werden, das in der Vagina vorherrscht. Das Vorhandensein einer der *SAPs* 4-6 war signifikant häufiger bei den symptomatischen Patientinnen der Fall. Dies lässt sich gut mit der Tatsache erklären, dass die Hyphenform die gewebsinvasive Form ist und somit bei einer Infektion häufiger anzutreffen ist als bei einer Besiedelung.

Solange über die Funktion der einzelnen *SAPs* wenig bekannt ist, muss das Expressionsmuster in seiner Gesamtheit betrachtet werden. Es ließ sich beobachten, dass *C. albicans*

auf exogenen Stress (antimykotische Therapie, Entzündungsreaktion) mit einer Hochregulation der Anzahl der gleichzeitig exprimierten *SAPs* reagiert. Zudem zeigte sich, dass die Expressionsmuster abhängig sind von Infektionsdauer, sprich Beschwerdedauer und der Infektionshäufigkeit pro Jahr, und dass einzelne *SAPs* individuelle Expressionszeitpunkte innerhalb des Infektionsverlaufs aufzeigen. Zusammenfassend konnten aus den vorliegenden *in vivo*-Daten insbesondere drei Kernaussagen abgeleitet werden:

- Es gibt keine gesicherte Koexpression von bestimmten *SAPs* im Infektionsverlauf.
- Die *SAP*-Expression *in vivo* ist sehr heterogen.
- Es gibt keine dominante *SAP*, die ein Therapietarget darstellen könnte.

So liegt anhand der vorliegenden Daten die Vermutung nahe, dass es bei Vaginalkandidosen keine dominierende Proteinase bei *C. albicans* gibt, sondern vielmehr das Zusammenwirken der *SAPs* die Potenz des Virulenzfaktors Aspartylproteinase ausmacht.

6 Literaturverzeichnis

- Bader, O., Schaller, M., Klein, S., Kukula, J., Haack, K., Muhlschlegel, F., Korting, HC., Schafer, W., Hube, B.** (2001) The KEX 2 gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity. *Mol Microbiol* **41**, 1431-1444
- Banerjee, A., Ganesan, K., Datta, A.** (1991) Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **272**, 28954-28961
- Beausejour, A., Grenier, D., Goulet, JP., Deslaurier, N.** (1998) Proteolytic activation of the interleukin -1β precursor by *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**, 676-681
- Bein, M., Schaller, M., Korting, H.** (2002) The secreted aspartic proteinases as a new target in the therapy of Candidiasis. *Curr Drug Targets* **3**, 351-357
- Blanco, M., Hurtado, C., Perez-Giraldo, C., Moran, F., Gonzales-Velasco, C., Gomez-Garcia, A.** (2003) Effects of ritonavir and saquinavir on *Candida albicans* growth rate and in vitro activity of aspartic proteinases. *Med Mycol* **41**, 167-170
- Bluestein, D., Rutledge, C., Lumsden, I.** (1991) Predicting the occurrence of antibiotic induced candidal vaginitis. *Fam Pract Res* **11**, 319-326
- Bohbot, JM.** (1995) Les mycoses génitales chroniques. Physiopathologie, traitement: jusqu'ou aller? *Réalités en Gynécologie-Obstetrique* **5**, 29-38
- Bohbot, JM.** (1996) Acquisitions récentes sur la physiopathologie des candidosis vulvo-vaginales. *Gyn Obs* **354**, 25-28
- Borg-von-Zepelin, M., Meyer, I., Thomssen, R., Würzner, R., Sanglard, D., Telenti, A., Monod, M.** (1999) HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Investing Dermatol* **113**, 747-751
- Caro, LH, Tettelin, H., Vossen, JH., Ram, AF., van den Ende, H., Klis, FM.** (1997) In silicio identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477-1489

- Chen, Y., Wu, C., Chung, W., Lee, F.** (2002) Differential secretion of SAP 4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology* **148**, 3743-3754
- Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159
- Chou, Q., Russell, M., Birch, DE., Raymond, J., Bloch, W.** (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl Acids Res.* **20**, 1717-1723
- Colina, A-R, Aumont, F., Deslaurier, N., Belhumeur, P., De Repenigny, L.** (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* **64**, 4514-4519
- Crampin, AC., Matthews, RC.** (1993) Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J Med Microbiol* **39**, 233-238
- De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schäfer, W., Casone, A.** (1999) Evidence that members of the secretory aspartic proteinase gene family, in particular SAP 2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* **179**, 201-208
- De Leon, E., Jacober, S., Sobel, J., Foxman, B.** (2002) Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type I and type II diabetes. *BMC Infect Dis* **2**, Epub Jan 30
- Denning, DW, Evan, EGB., Kibbler, CC., Richardson, MD., Roberts, MM., Rogers, TR., et al.** (1995) Working group of the British Society for Medical Mycology. Management of genital candidiasis. *Br Med J* **310**, 1241-1244
- Dostal, J., Hamal, P., Pavlickova, L., Soucek, M., Ruml, T., Pichova, I., Hruskova-Heidingsfeldova, O.** (2003) Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol* **41**, 712-716
- Fallon, K., Bausch, K., Noonan, J., Huguenel, E., Tamburini, P.** (1997) Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* **65**, 551-556

- Foxman, B.** (1990) The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: risk factors. *Am J Public health* **80**, 329-331
- Ferrer, J.** (2000) Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet* **71** suppl 1, 21-27
- Fidel, PL., Sobel, JD.** (1996) Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* **9**, 335-348
- Fidel, P., Vazquez, JA., Sobel, JD** (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. *Clin Microb Rev* **12**, 80-96
- Geiger, AM., Foxman, B.** (1996) Risk factors for vulvovaginal candidiasis. A case control study among university students. *Epidemiology* **7**, 182-187
- Gilfillan, GD., Sullivan, D.J., Haynes, K., Parkinson, T., Coleman, DC., Gow, NA.** (1998) *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144**, 829-838
- Grillot, R.** (1996) Mycoses genitales. Les mycoses humaines: demarche diagnostique. *Elsevier, Paris*, 116-124
- Homma, M., Chibana, H., Tanaka, K.** (1993) Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **139**, 1187-1193
- Hube, B., Monod, M., Schofield, DA., Brown, AJP., Gow, NAR.** (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**, 87-99
- Hube, B.** (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Topics Med Mycol* **7**: 55-69
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, FC., Heß, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, AJP., Gow, NAR.** (1997) Gene disruption of each of the Secretory Aspartyl Proteinase Genes SAP1, SAP2 and SAP3 in *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* **65**, 3529-3538

- Hube, B., Naglik, J.** (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**, 1997-2005
- Hurley, R., De Luvois, J.** (1979) *Candida* vaginitis. *Proc R Soc Med* **70** suppl; 4, 1-8
- Hurley, R.** (1981) Recurrent *Candida* infection. *Clin Obstet Gynecol* **8**, 209-213
- Kaminishi, H., Hamatake, H., Cho, T., Tamaki, T., Suenaga, N., Fujii, T., Hagihara, Y., Maeda, H.** (1994) Activation of blood clotting factors by microbial proteinases. *FEMS Microbiol Lett* **121**, 327-332
- Kaminishi, H., Miyaguchi, H., Tamaki, T., Suenaga, N., Hisamatsu, M., Mihashi, I., Matsumoto, H., Maeda, H., Hagihara, Y.** (1995) Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **63**, 984-988
- Koelsch, G., Tang, J., Loy, JA., Monod, M., Jackson, K., Foundling, SI., Lin, X.** (2000) Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1480**, 117-131
- King, RD., Lee, JC., Morris, AL.** (1980) Adherence of *Candida albicans* and other candida species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* **27**, 667-674
- Koenig, H., Walle, RJ., Krener, M.** (1989) Diagnosis and epidemiology of 70.000 isolated yeasts. *Rev Fr Lab* **197**, 34-40
- Krivan, HC.** (1989) Microbial adhesion: glycolipids as possible receptors for vaginal pathogens. *Orlando, FL: Second International Conference on Vaginitis*, March Abstract 29:P3
- Linhares, LM., Witkin, SS., Miranda, SD., Fonseca, AM., Pinotti, JA., Ledger, WJ.** (2001) Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol* **9**, 221-225
- Macphail, G., Taylor, G., Buchanan-Chell, M., Ross, C., Wilson, S., Kureishi, A.** (2002) Epidemiology, treatment and outcome of Candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. *Mycoses* **45**, 141-145

- Magee, B., Hube, B., Wright, R.J., Sullivan, P.J., Magee, P.T.** (1993) The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect Immun* **618**, 3240-3243
- McNeil, M., Nash, S., Hajjeh, R.** (2001) Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States 1980-1997. *Clin Infect Dis* **33**, 641-647
- Monod, M., Togni, G., Hube, B., Sanglard, D.** (1994) Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**, 357-368
- Monod, M., Hube, B., Hess, D., Sanglard, D.** (1998) Differential regulation of SAP 8 and SAP 9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**, 2731-2737
- Monod, M., Jatou-Ogay, K., Reichard, U.** (1999) *Aspergillus fumigatus*-secreted proteases as antigenic molecules and virulence factors. *Contrib Microbiol* **2**, 182-192
- Morrow, B., Srikantha, T., Soll, DR.** (1992) Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP 1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **12**, 2997-3005
- Morrow, B., Ramsey, H., Soll, DR.** (1994) Regulation of phase-specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A. *J Med Vet Mycol* **32**, 287-294
- Morschhäuser, J., Virkola, R., Korhonen, TK., Hacker, J.** (1997) Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 349-355
- Moyal Barraco, M.** (1996) Candidosis vulvo.vaginales recidivants. Manifestations cliniques, diagnostic mycologique, facteurs favorisants, traitement. *Reprod Hum Horm* **9**, 53-61
- Munro, C., Hube, B.** (2002) Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol* **10**, 173-177
- Naglik, J., Newport, G., White, TC., Fernandes-Naglik, L., Greenspan, J., Greenspan, D., Sweet, SP., Challacombe, SJ., Agabian, N.** (1999) In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* **67**, 2482-2490

- Naglik, J., Rodgers, C., Shirlaw, P., Dobbie, J., Fernandes-Naglik, L., Greenspan, D., Agabian, N., Challacombe, S.** (2003) Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in human correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* **188**, 469-479
- Nyirjesy, P., Seeney, SM., Grody, MHT., Jordan, CA., Buckley, HR.** (1995) Chronical fungal vaginitis: the value of cultures. *Am J Obstet Gynecol* **173**, 820-823
- Odds, FC.** (1988) *Candida and Candidosis*, 2nd ed. Bailliere Tindall, London, United Kingdom
- Petersen, EE., Distler, C.** (1999) Vorkommen von Hefepilzen im Vulvovaginalbereich bei symptomatischen und asymptomatischen Frauen. *Geburtsh u Frauenheilk* **59**, 470-474
- Reed, B.** (1992) Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol Survey* **47**, 551-560
- Reed, B., Gorenflo, D., Gillespie, B., Pierson, C., Zazove, P.** (2000) Sexual behaviors and other risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *J Womens health Gend based Med* **9**, 645-655
- Rodrigues, AG, Mardh, PA, Pina -Vaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., da Fonseca, AF.** (1999) Is the lack of concurrence of bacterial vaginosis and vaginal candidosis explained by the presence of bacterial amines? *Am J Obstet Gynecol* **181**, 376-370
- Rüchel, R., Ritter, B., Schaffrinski, M.** (1990) Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. *Zbl Bakteriol* **273**, 391-403
- Rüchel, R., Zimmermann, F., Böning-Stutzer, B., Helmchen, U.** (1991) Candidosis visualized by proteinase-directed immunofluorescence. *Virchow's Archiv A Pathological Anatomy* **419**, 199-202
- Rüchel, R.**(1992) Proteinase. In: Bennett, JE., Hay, RJ., Peterson, PK. (eds.) *New Strategies in Fungal Disease*. Churchill Livingstone: Edinburgh 1992, 17-31
- Saiki, RK., Gelfand, DH., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, GT., Mullis, KB., Erlich, HA.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, FC., Gow, NAR.** (1997) A triple deletion in the SAP4, SAP5 and SAP6 secretory aspartyl proteinase genes of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* **65**, 3539-3546
- Schaller, M., Schäfer, W., Korting, HC., Hube, B.** (1998) Differential expression of secreted aspartic proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* **29**, 605-615
- Schaller, M., Korting, HC., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W., Hube, B.** (1999) Secreted aspartic proteinase (SAP) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* **34**, 169-180
- Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E., Hube, B.** (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Investig Dermatol* **114**, 712-717
- Schaller, M., Bein, M., Korting, H., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S., Hube, B.** (2003) The secreted aspartyl proteinases SAP 1 and SAP 2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* **71**, 3227-3234
- Schofield, D., Westwater, C., Warner, T., Nicholas, P., Paulling, E., Balish, E.** (2003) Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J Infect Dis* **188**, 591-599
- Smolenski, G., Sullivan, PA., Cutfield, SM., Cutfield, JF.** (1997) Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual SAP1, SAP2 and SAP3 isoenzymes. *Microbiology* **143**, 349-356
- Sobel, JD., Myer, P., Levison, ME.** (1981) *Candida albicans* adherence to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* **143**, 76-82
- Sobel, JD.** (1985) Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* **152**, 924-935
- Sobel, JD.** (1993) Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* **36**, 153-165
- Sobel, JD.** (1996) *Candida* vulvovaginitis. *Sem Dermatol.* **15**, 17-28

- Spinillo, A., Pizzoli, G., Colonna, L., Nicola, S., De Seta, F., Guaschino, S.** (1993) Epidemiologic characteristics of women with idiopathic vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* **81**, 721-727
- Spinillo, A., Nicola, S., Colonna, L., Marangoni, F., Cavanna, C., Michelone, G.** (1994) Frequency and significance of drug resistance in vulvovaginal candidiasis. *Gynecol Obstet Invest* **38**, 130-133
- Spinillo, A., Capuzzo, E., Egbe, TO., Baltaro, F., Nicola, S., Piazzi, G.** (1995) Torulopsis glabrata vaginitis. *Obstet Gynecol* **85**, 993-998
- Staib, F.** (1965) Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* **4**, 187-193
- Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schäfer, W., Hube, B.** (2000) Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Mycoses* **43**, Suppl. 2, 17-21
- Togni, G., Sanglard, D., Quadroni, M., Foundling, SI., Monod, M.** (1996) Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of preproregion cleavages in *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**, 493-503
- Tsushima, H., Mine, H., Kawakami, Y., Hyodoh, F., Ueki, A.** (1994) *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. *Microbiology* **140**, 167-171
- Weissenbacher, ER.** (1993) Fluorpraktikum. Medifact Verlag, Landsberg, Deutschland
- Weissenbacher, ER., Spitzbart, H.** (1998) Therapie der Vulvovaginalcandidosen. In: Mykosen in der Frauenheilkunde, Diagnostik und Therapie, Fluorpraktikum II, 1.Aufl., Medifact Verlag, München, Deutschland
- White, TC., Miyasaki, SH., Agabian, N.** (1993) Three distinct secreted aspartic proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **175**, 6126-6133
- White, TC., Agabian, N.** (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, levels are determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* **177**, 5215-5221

Zaugg, C., Borg-Von Zepelin, M., Reichard, U., Sanglard, D., Monod, M. (2001)
Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* **69**, 405-412

7 Anhang

7.1 Material und Bezugsquellen

7.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Agarose	Roth
Aqua ad iniectabilia	Braun
Chloroform	Sigma
RNA <i>later</i>	Ambion
DEPC-treated Water	Invitrogen
DNase I Puffer (10x)	Invitrogen
dNTPs	Perkin Elmer
EDTA	Invitrogen
Etidiumbromid	Sigma
Ethanol (70%)	Apotheke der Innenstadtkliniken, München
Isopropanol	Sigma
Magnesiumchlorid Lösung (25 mM)	Perkin Elmer
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen
PCR PufferII (10x)	Perkin Elmer
PeqGOLD RNAPure	peQlab

7.1.2 Enzyme

Amplitaq DNA Polymerase	Perkin Elmer
Deoxyribonuclease I	Invitrogen
DNaseI	Invitrogen
Ribonuclease H	Invitrogen
SuperScript II reverse Transkriptase	Invitrogen

7.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

7.1.3.1 Lösungen und Puffer

10 x TBE	Roth
1 M Tris	
1 M Borsäure	
20 mM EDTA	
1 x TE	Roth
10 mM Tris-Cl (pH 8,0)	
1 mM EDTA	
Loading Solution (Bromophenol Blau)	Promega Madison

7.1.3.2 Kulturmedien

Sabouraud-Agar	BioMerieux
Chromagarplatten	BBL Chromagar
	Becton Dickinson, Sparks, USA

7.1.4 Molekularbiologische Hilfsmittel

Gasperlen (425-600 microns)	Sigma
Mineralöl	Applied Biosystems

7.1.5 DNA-Längenstandard

Hae II Digest Phi X174	New England Biolabs
------------------------	---------------------

7.2 Technische Geräte

Thermocycler, Typ 480	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut/USA
Thermocycler, Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut/USA

Pipetten

Tischzentrifuge, Typ Z230 MR

Gelelektrophoreseapparatur, Typ HE 33

UV-Leuchtkasten, Typ N 90

Vortexgerät, Typ VF 2

Brutschrank, Typ 2770

Gilson

Hermle, Deutschland

Hofer, San Francisco, USA

Pharmacia LKB, San Francisco, USA

UniEquip, Martinsried, Deutschland

IKA-Labortechnik, Deutschland

Köttermann, Deutschland

7.3 Gensequenzen

Im Folgenden werden die Sequenzen der *SAP*-Gene und des Elongationsfaktorgens *EFB1* gezeigt. Die als Primer-Sequenzen verwendeten Stellen wurden grau hinterlegt.

SAP1:

(auf Chromosom 6)

```
1 tatattctgatggataaatgttataatcttgaaaaacatataaatatgggagttggatctataactttattgaaataaatca 80
81 tatttaaatccaacaatcaatcaatttactcttccattttctaacaaca ATG TTT TTA AAG AAT ATT TTC ATC 152
153 GCT CTT GCT ATT GCT TTA TTA GTT GAT GCT TCT CCA GCT AAA AGA TCC CCA GGT TTT GTC 212
213 ACT TTA GAC TTT GAT GTC ATT AAA ACT CCT GTT AAT GCT ACT GGT CAA GAA GGT AAA GTT 272
273 AAA AGA CAA GCC ATC CCA GTT ACT TTA AAT AAT GAA CTC GTT AGT TAT GCT GCT GAC ATC 332
333 ACT ATT GGT TCC AAT AAA CAA AAG TTT AAT GTT ATT GTT GAT ACT GGA TCT TCT GAT TTA 392
393 TGG GTT CCT GAT GCT TCT GTT ACT TGT GAT AAA CCT CGT CCT GGT CAA TCA GCA GAT TTC 452
453 TGT AAA GGG AAA GGT ATT TAC ACT CCA AAA TCT TCT ACC ACT TCT CAA AAT TTG GGT AGC 512
513 CCA TTT TAT ATT GGT TAT GGT GAT GGT AGT TCC TCT CAA GGC ACT TTG TAT AAA GAT ACT 572
573 GTT GGT TTT GGT GGT GCT TCA ATC ACA AAG CAA GTC TTT GCC GAT ATC ACC AAG ACT TCT 632
633 ATT CCT CAA GGG ATT TTA GGT ATT GGT TAT AAA ACC AAT GAG GCT GCT GGT GAT TAT GAT 692
693 AAT GTT CCA GTT ACT TTG AAG AAC CAA GGA GTT ATT GCC AAG AAT GCT TAT TCA CTT TAT 752
753 CTC AAC TCT CCC AAT GCT GCC ACT GGA CAA ATC ATT TTC GGT GGG GTT GAC AAA GCT AAA 812
813 TAC AGT GGT TCA TTG ATT GCT GTT CCT GTC ACT TCT GAT AGA GAA TTA AGA ATC ACT TTG 872
873 AAT TCT CTC AAA GCT GTT GGC AAA AAT ATC AAT GGT AAT ATC GAT GTT CTT TTA GAT TCT 932
933 GGT ACC ACA ATT ACT TAT CTT CAA CAA GAT GTT GCT CAA GAT ATT ATT GAT GCC TTC CAA 992
993 GCT GAA TTG AAA CTG GAT GGT CAA GGT CAT ACT TTC TAT GTT ACT GAT TGT CAA ACT TCT 1052
1053 GGA ACT GTT GAT TTC AAT TTT GAC AAC AAC GCC AAG ATT TCT GTT CCA GCT TCT GAA TTT 1112
1113 ACT GCT CCG TTG AGC TAC GCT AAC GGT CAA CCT TAT CCA AAA TGT CAA CTT CTT TTA GGT 1172
1173 ATT AGT GAT GCT AAT ATT CTT GGT GAT AAC TTT TTG AGA TCA GCT TAC CTT GTT TAT GAT 1232
1233 TTG GAT GAT GAT AAA ATT TCT TTA GCT CAA GTT AAA TAC ACT TCT GCT TCA AAC ATT GCT 1292
1293 GCT CTT ACC TAG agatacctacttttttaggttataagtgtcgattaaaatgccatccttttaggtcctttctttttt 1368
1369 ttgttggtgttattcttttctagttgacatttttttcttattattattacaattattaaatctattagtagtacttacta 1448
1449 tgtaagcaaatcttattaactctactctctag 1480
```

SAP2:

(auf Chromosom R)

```
1 gatatctaattttcaaaaaaaaaagaatagtataaaaaggatagttgattcctcttggttgttgaaaatttgaataatatcaat 80
81 caatcaatcaaataacaacaacccactagacatcaccatttatca ATG TTT TTA AAG AAT ATT TTC ATT 149
150 GCT CTT GCT ATT GCT TTA TTA GTC GAT GCT ACT CCA ACA ACA ACC AAA AGA TCA GCT GGT 209
210 TTC GTT GCT TTA GAT TTC AGT GTT GTG AAA ACT CCT AAA GCA TTC CCA GTT ACT AAT GGT 269
270 CAA GAA GGT AAA ACT TCC AAA AGA CAA GCT GTC CCA GTG ACT TTA CAC AAT GAA CAA GTC 329
330 ACT TAT GCT GCT GAT ATT ACC GTT GGA TCC AAT AAT CAA AAA CTT AAT GTT ATT GTT GAT 389
390 ACT GGA TCA TCT GAT TTA TGG GTT CCT GAT GTT AAT GTT GAT TGT CAA GTC ACT TAT AGT 449
450 GAT CAA ACT GCA GAT TTC TGT AAA CAA AAG GGG ACA TAT GAT CCA AGT GGT TCA TCA GCT 509
510 TCA CAA GAT TTG AAT ACT CCA TTC AAA ATT GGT TAT GGT GAT GGA TCT TCA TCT CAA GGT 569
570 ACT TTA TAT AAG GAT ACC GTT GGA TTT GGT GGT GTT TCG ATT AAA AAT CAA GTT TTA GCT 629
630 GAT GTT GAT TCT ACT TCA ATT GAT CAA GGT ATT TTA GGA GTT GGT TAT AAA ACC AAT GAA 689
690 GCC GGT GGT AGT TAT GAT AAT GTC CCT GTC ACT TTA AAA AAA CAA GGA GTC ATT GCT AAG 749
750 AAT GCT TAT TCA CTT TAT CTT AAT TCT CCA GAT GCT GCC ACG GGA CAA ATA ATT TTC GGT 809
810 GGG GTT GAT AAT GCT AAA TAT AGT GGT TCA TTA ATT GCA TTA CCA GTT ACT TCT GAT CGT 869
870 GAA TTA AGA ATT AGT TTG GGT TCA GTT GAA GTT TCT GGT AAA ACC ATC AAT ACT GAT AAT 929
930 GTC GAT GTT CTT TTG GAT TCA GGT ACC ACC ATT ACT TAT TTG CAA CAA GAT CTT GCT GAT 989
990 CAA ATC ATT AAA GCT TTC AAT GGT AAA TTA ACT CAA GAT TCC AAT GGT AAT TCA TTC TAT 1049
1050 GAA GTT GAT TGT AAT TTG TCA GGG GAT GTT GTA TTC AAT TTT AGT AAA AAT GCT AAA ATT 1109
1110 TCC GTT CCA GCT TCC GAA TTT GCT GCT TCT TTA CAA GGT GAT GAT GGT CAA CCA TAT GAT 1169
1170 AAA TGT CAA TTA CTT TTC GAT GTT AAT GAT GCT AAC ATT CTT GGT GAT AAC TTT TTG AGA 1229
1230 TCA GCT TAT ATT GTT TAT GAT TTG GAT GAT AAT GAA ATT TCT TTG GCT CAA GTC AAA TAT 1289
1290 ACT TCT GCT TCC AGT ATT TCT GCC TTG ACC TAA gatgaaggggtggaataaa 1341
```

SAP3:

(auf Chromosom 3)

```
1 gaattcaacttgggtgccgtgtatcaaaacaaccacacttgtgagaacctccttcccagtaaaactgaagtaggatagagt 80
81 agctctcattgggaaaggggtattaccatgattgaagaatagtgaacaatatataaataaggctggataaccttctctaa 160
      →
161 aattatggattggaacatttctaattcaatcaattaacttccacacacacatacacatatataaaca ATG TTT 235
236 TTA AAA AAT ATC TTT ATT GCT CTT GCT ATT GCT TTA TTA GCT GAT GCT ACT CCA ACA ACT 295
296 TTC AAC AAT TCT CCA GGG TTT GTT GCT TTG AAT TTT GAT GTT ATC AAA ACT CAT AAA AAT 355
356 GTT ACT GGT CCC CAA GGT GAA ATC AAT ACC AAC GTC AAC GTC AAG AGA CAA ACT GTT CCA 415
416 GTT AAA TTA ATT AAT GAA CAA GTT AGT TAT GCT TCT GAT ATT ACT GTT GGT TCC AAT AAA 475
476 CAA AAA TTA ACT GTT GTT ATT GAT ACT GGA TCA TCT GAT TTA TGG GTT CCT GAT TCT CAA 535
536 GTT TCA TGT CAA GCT GGT CAA GGA CAA GAT CCA AAT TTT TGT AAA AAT GAA GGA ACT TAT 595
596 TCC CCA AGT TCT TCA AGT AGT TCT CAA AAT TTG AAT AGT CCA TTT AGT ATT GAA TAT GGT 655
656 GAT GGA ACT ACT TCA CAA GGG ACA TGG TAT AAA GAT ACT ATT GGA TTT GGT GGT ATT TCT 715
716 ATC ACA AAG CAA CAA TTT GCC GAT GTT ACT AGT ACA TCA GTT GAT CAA GGG ATT TTA GGG 775
776 ATT GGT TAT AAA ACT CAT GAA GCT GAA GGT AAT TAT GAT AAT GTT CCT GTG ACT TTA AAA 835
836 AAT CAA GGA ATT ATT TCT AAA AAT GCT TAT TCA CTT TAT CTT AAT TCA AGA CAA GCC ACT 895
896 AGT GGA CAA ATT ATT TTT GGT GGT GTT GAT AAT GCT AAA TAT AGT GGG ACA TTG ATT GCT 955
956 TTA CCA GTT ACT TCT GAT AAT GAA TTA AGA ATT CAT TTG AAT ACT GTA AAA GTT GCT GGA 1015
1016 CAA TCC ATT AAT GCT GAT GTT GAT GTT TTG TTG GAT TCA GGT ACT ACC ATT ACT TAT TTA 1075
1076 CAA CAA GGT GTT GCT GAT CAA GTG ATT AGT GCT TTT AAT GGT CAA GAA ACT TAT GAT GCT 1135
1136 AAT GGT AAT CTT TTC TAT CTT GTT GAT TGT AAT TTG TCA GGA TCA GTT GAT TTT GCT TTT 1195
1196 GAT AAA AAT GCT AAA ATT TCC GTT CCA GCT TCT GAA TTT ACT GCT CCA TTA TAC ACT GAA 1255
1256 GAT GGT CAA GTT TAT GAT CAA TGT CAA CTT CTT TTT GGA ACT AGT GAT TAT AAC ATT CTT 1315
1316 GGT GAT AAT TTC TTG AGA TCA GCC TAT ATT GTT TAT GAT TTG GAT GAT AAT GAA ATT TCA 1375
1376 TTA GCT CAA GTT AAG TAT ACT ACT GCT TCT AAC ATT GCT GCT CTT ACT TAG ggggaagtactc 1438
      ←
1439 ctctggagattgattcttatttttgattctattcaatagaacatttcggtttagcttggtttattattggttagactttat 1518
1519 agcttctttttggttactttttactttttacttttattag 1556
```


SAP4:

(auf Chromosom 6)

→

1 ggatccaacaatcttcaaatgttttaattttcattaacaaccaaccatttcattcattcaaatagtcattcattcctt 80

81 taataccgactatcattccctcctttataactaatccaaagttcaactcaaccaaca ATG TTC TTA CAA AAT 152

153 ATC TTG AGT GTT CTT GCT TTC GCT TTA TTA ATT GAT GCT GCT CCA GTT AAA AGA TCT ACA 212

213 GGG TTT GTT ACC TTA GAC TTT AAT GTC AAA AGA TCC CTT GTT GAT CCA AAA GAT CCA ACT 272

273 GTC GAA GTT AAA AGA TCA CCT TTA TTT TTA GAT ATT GAG CCC ACA GAA ATT CCC GTC GAC 332

333 GAT ACT GGT AGA AAT GAT GTG GGC AAA AGA GGA CCT GTT GCA GTT AAA TTG GAC AAT GAA 392

393 ATT ATT ACT TAT TCT GCT GAT ATT ACG ATT GGT TCA AAT AAC CAA AAA CTT AGC GTT ATT 452

453 GTT GAC ACT GGC TCT TCT GAC TTG TGG GTT CCA GAT TCA AAT GCC GTT TGT ATT CCA AAA 512

513 TGG CCT GGT GAC AGA GGA GAC TTC TGT AAG AAT AAC GGT TCC TAT TCT CCA GCT GCT TCT 572

573 AGC ACT TCC AAA AAT TTG AAT ACT CCT TTT GAA ATC AAA TAT GCC GAT GGT TCT GTT GCA 632

633 CAA GGT AAC TTG TAT CAA GAT ACC GTT GGT ATT GGT GGT GTT TCT GTT AGA GAT CAA TTA 692

693 TTT GCT AAC GTT AGG TCT ACT AGT GCT CAT AAA GGT ATT TTA GGT ATT GGT TTT CAA AGC 752

←

753 AAC GAA GCC ACC AGG ACT CCT TAC GAC AAT CTT CCT ATT ACT TTG AAA AAA CAA GGC ATT 812

813 ATT TCT AAA AAT GCT TAT TCC CTT TTC CTT AAC TCT CCT GAA GCT TCT TCT GGA CAA ATT 872

873 ATT TTT GGT GGT ATT GAC AAG GCC AAG TAT AGC GGC TCT TTA GTT GAT TTG CCA ATT ACT 932

933 TCT GAT AGA ACA TTA AGT GTC GGT TTA AGA TCT GTC AAT GTT ATG GGA CAA AAT GTC AAT 992

993 GTC AAC GCT GGT GTC CTC TTA GAT TCT GGT ACT ACT ATC AGT TAT TTC ACT CCA AAT ATT 1052

1053 GCT CGT AGC ATT ATC TAT GCC TTA GGT GGT CAA GTG CAT TAT GAT TCT TCT GGT AAT GAA 1112

1113 GCT TAT GTT GCT GAT TGT AAA ACT TCA GGT ACC GTT GAT TTC CAA TTC GAT AGA AAC CTC 1172

1173 AAG ATT TCC GTT CCT GCT TCG GAA TTC CTT TAC CAA TTA TAT TAC ACT AAT GGT GAA CCT 1232

1233 TAT CCA AAA TGT GAA ATT CGT GTT CGT GAA AGT GAA GAT AAT ATT CTT GGT GAC AAC TTC 1292

1293 ATG AGA TCA GCT TAC ATT GTC TAC GAT TTG GAT GAT AGA AAG ATC TCC ATG GCT CAA GTT 1352

1353 AAA TAC ACT TCC CAG TCT AAC ATT GTT GGT ATT AAT TAG acgacattggtttagattaattgtcgg 1419

1420 ttactaccttccttcaaaattggttgtttgcatcttaataaccatttataaatcaaaaggaagtgtatattttttgtct 1499

1500 ctattgggttttttagaaaatgacagttattgattaatatctattagatgaatatatatatccattacatatgcctaa 1579

1580 atcgtgagtgaactttaatgtagtaatgattcgagaacc 1618

SAP5:

(auf Chromosom 6)

→

1 aaataccatacattcaaatggcaagctcgaatattaattatctggtttccaaaactatataaagatgtcaatgtatccca 80

81 caattttattttaaaaagtcctttctctctccaccaacaatcaatcactcattcattcattcaaatagtcattcattcctt 160

161 tattaccgactattattcattcctttattaccgactatcattcattcctttattaccgactatcattcactcctttataa 240

241 ctaatccaaaagttaagctcaaccaaca ATG TTC TTG AAA AAT ATC TTG AGT GTT CTT GCT TTT GCT 306

307 TTA TTA ATT GAT GCG GCT CCA GTT AAA AGA TCT CCA GGG TTT GTT ACC TTA GAC TTT AAT 366

367 GTC AAG AGA TCT CTT GTT GAT CCA GAT GAT CCA ACT GTT GAA GCT AAA AGA TCT CCT TTA 426

427 TTT TTA GAG TTT ACT CCC TCA GAA TTT CCC GTC GAT GAG ACT GGT AGA GAT GGT GAT GTG 486

487 GAC AAA AGA GGA CCT GTT GCA GTT ACT TTG CAC AAT GAA GCT ATT ACT TAT ACT GCT GAT 546

547 ATT ACT GTT GGT TCA GAT AAC CAA AAA CTT AAT GTT ATT GTT GAC ACT GGG TCT TCT GAC 606

607 TTG TGG ATT CCA GAT TCA AAC GTT ATT TGT ATT CCA AAA TGG CGT GGT GAC AAA GGA GAC 666

667 TTC TGT AAG AGT GCT GGT TCT TAT TCC CCA GCA TCT TCC CGC ACT TCC CAA AAT TTG AAT 726

727 ACC CGT TTT GAC ATT AAA TAT GGT GAC GGT TCT TAC GCT AAA GGT AAG TTG TAT AAA GAT 786

787 ACC GTT GGT ATT GGT GGT GTT TCT GTT AGA GAT CAA TTA TTT GCT AAC GTT TGG TCT ACT 846

847 AGT GCT CGT AAG GGT ATT TTA GGT ATT GGT TTT CAA AGC GGC GAA GCT ACC GAG TTT GAT 906

907 TAC GAC AAT CTT CCT ATT AGT TTG AGA AAT CAA GGT ATT ATT GGT AAA GCT GCT TAT TCC 966

967 CTC TAC CTT AAC TCT GCT GAA GCT TCT ACT GGG CAA ATT ATT TTT GGT GGT ATT GAC AAG 1026

1027 GCC AAG TAC AGT GGC TCT TTA GTT GAT TTA CCA ATC ACT TCC GAA AAA AAA TTA ACT GTC 1086

1087 GGT TTA AGA TCT GTC AAT GTT AGG GGA CGA AAT GTT GAT GCT AAC ACT AAT GTC CTT TTA 1146

1147 GAT TCT GGT ACT ACT ATC AGT TAT TTC ACT AGA AGT ATT GTT CGT AAC ATT CTC TAT GCC 1206

1207 ATA GGT GCT CAA ATG AAG TTT GAC TCT GCT GGT AAT AAA GTT TAT GTT GCT GAT TGT AAA 1266

1267 ACT TCA GGT ACC ATT GAT TTC CAA TTT GGT AAT AAC CTC AAG ATC TCC GTT CCT GTT TCC 1326

1327 GAA TTC CTT TTC CAA ACA TAT TAC ACT AGT GGT AAA CCT TTC CCA AAA TGT GAA GTT CGT 1386

1387 ATT CGT GAA AGT GAA GAT AAT ATT CTT GGT GAC AAC TTT TTA AGA TCA GCT TAT GTT GTC 1446

1447 TAC AAT TTG GAC GAT AAG AAA ATC TCC ATG GCT CCA GTT AAA TAC ACT TCC GAG TCT GAC 1506

←

1507 ATT GTT GCT ATT AAT TAA agaactttgacttttagattaattatcgatttgetgccttccttcaaaattggttgt 1580

1581 ttgcatcttaataaccattttataaatcaaag 1611

SAP6:

(auf Chromosom 6)

→

1 gaattcaaaaaactatataaaagatgcctatggatcctacaattttcttcaaacggttttaattctcttcaccaacaatcaat 80

81 caatcattcattcattcaaatagtcattcattcctttggtaccgactattattcattcctttattaccgactatcattca 160

161 ttcctttattaccgactatcattcactcctttataactaatctaaagttaagctcaaccaaca ATG TTC TTG AAA 235

236 AAT ATC TTG AGT GTT CTT CGT TTC GCT TTA TTA ATT GAT GCT GCT CCA GTT AAA AGA TCT 295

296 CCA GGG TTT GTT ACC TTA GAC TTT AAT GTC AAG AGA TCC CTT GTT GTA CCA GAT GAT CCA 355

356 ACT GCC GAA TCT AAA AGA TCA CCT TTA TTT TTA GAT CTT GAT CCC ACA CAA ATT CCC GTC 415

416 GAT GAT ACT GGT AGA AAT GTA GGT GTG GAC AAA AGA GGA CCT GTT GCA GTT AAA TTG GAC 475

476 AAT GAA ATT ATT ACT TAT TCT GCT GAT ATT ACT GTT GGT TCC AAT AAC CAA AAG CTT AGC 535

536 GTT ATT GTT GAC ACT GGG TCT TCT GAT TTG TGG ATT CCA GAC TCA AAA GCC ATT TGT ATT 595

596 CCA AAA TGG CGT GGT GAC TGT GGT GAC TTC TGT AAG AAT AAC GGT TCT TAT TCT CCA GCT 655

656 GCT TCT AGC ACT TCC AAA AAT TTG AAT ACC CGT TTT GAA ATT AAA TAT GCT GAT GGT TCT 715

716 TAC GCA AAA GGT AAC TTG TAT CAA GAT ACC GTT GGT ATT GGT GGT GCT TCT GTT AAA AAT 775

776 CAA TTA TTT GCT AAC GTT TGG TCT ACT AGT GCT CAT AAA GGT ATT TTA GGT ATT GGT TTC 835

836 CAA ACC AAC GAA GCT ACC AGA ACT CCT TAC GAC AAT CTT CCT ATT AGT TTG AAA AAA CAA 895

896 GGC ATT ATT GCC AAA AAT GCT TAT TCT CTC TTC CTT AAC TCT CCT GAA GCT TCT TCT GGG 955

956 CAA ATT ATT TTT GGT GGT ATT GAC AAG GCC AAG TAC AGT GGC TCT TTA GTT GAA TTA CCA 1015

1016 ATT ACT TCT GAC AGA ACA TTA AGT GTC GGT TTA AGA TCT GTC AAT GTT ATG GGA CGA AAT 1075

1076 GTT AAT GTC AAC GCT GGT GTC CTC TTA GAT TCT GGT ACT ACT ATC AGT TAT TTC ACT CCA 1135

1136 AGT ATT GCT CGT AGC ATT ATC TAT GCC TTA GGT GGT CAA GTG CAT TTT GAT TCT GCT GGT 1195

1196 AAT AAA GCT TAT GTT GCT GAT TGT AAA ACT TCA GGT ACC GTT GAT TTC CAA TTC GAT AAA 1255

1256 AAC CTC AAG ATC TCC GTT CCT GCT TCG GAA TTC CTT TAC CAA TTG TAT TAC ACT AAT GGT 1315

1316 AAA CCT TAT CCA AAA TGT GAA ATT CGT GTT CGT GAA AGT GAA GAT AAT ATT CTT GGT GAC 1375

1376 AAC TTC ATG AGA TCA GCT TAC ATT GTC TAC GAT TTG GAC GAT AAG AAA ATC TCC ATG GCT 1435

1436 CAA GTT AAA TAC ACT TCC GAG TCT AAC ATT GTT GCT ATT AAT TAG aaaactttggttttagatta 1500

←

1501 attatcgatttgctgccttcctttaaattggttatttatattttgaagtcatttatgaaatcaaaggaagtgtgtattt 1580

1581 ttttgtctctattgggggttttttttagaatcgacaatttttgatcaaatatctattagaatgaatatataaatgcattat 1660

1661 atatgtctaaaattgagtgactttaaattgtagtggttaattgagcagtatatcttttttaaattctgataaatatccttgt 1740

1741 ttgaattgctaatgaacgttttgatataaattacctaattgaagaagatcattcaagctgtactgttagaaaaatca 1820

1821 ccgaaatgtaacattgtggggaattc 1846

SAP8:

(auf Chromosom 3)

```
1  gtaccagacaaatcagtaaactttaaatatacaaccacaatTTTTtatgagcctctcttaccaccgtaaagtcaaacgg 80
81  catcattctcttggtggttgaatttgaaaaattaatgatagatatgTTTgtttacatgaataaaatgaacattataaat 160
161 aaagcccaaatacccttcttttacaagatttcacaactctacttcaaatcaacaaaccaaacacttaaacacttaaacacttaa 240
241 ccaaataca ATG GTC TCC ATT ATT ACT TTT ACC AAA AAC GTT CTT GTT ACA CTT GCT TTT 300
301 GCT TTA TTG GCT CAA GGT CTT GCT ATC CCT GAA GAC ATT GAT AAA AGA GCT GAA AAA GTT 360
361 GTC TCA TTA GAT TTT ACC GTT ACC AGA AAA CCT TTT AAT GCT ACT GCT CAT GGA CAA CAT 420
421 CAT CAA TCC CAA CAG CAG CAG CAA CAA CAA CAA CAA CCA GCT CAA AAA AGA GGA ACT 480
481 GTT CAA ACA AGT TTG ATT AAT GAA GGT CCA TCA TAT GCT GCT ACC ATC ACT GTT GGT TCA 540
541 AAC AAA CAA CAA CAA ACT GTT ATT GTT GAC ACA GGT TCT TCT GAT TTA TGG GTG GTT GAT 600
601 TCT GCT GCC GTT TGT CAA GTC ACT TAT CCT GGT CAA TCA CCA ACT TTT TGT AAA CAA GAT 660
661 GGT ACT TAT AAA CCT TCT TCT TCC ACA ACA TCT CAA AAT TTA GGT AAA GCT TTC TCC ATT 720
721 AGA TAT GAA GAT GGA AGT TCT TCT CAA GGT ACT GTT TAT AAG GAT ACT ATT GGT TTA GGT 780
781 GGT GCT TCA ATT ACC AAT CAA CAA TTT GCT GAT GTC ACT ACG ACT TCA GTT GAT CAA GGT 840
841 ATT TTA GGT ATT GGA TTC ACT GGT GAT GAA AGT AGT CCA ACC TAT GAT AAT GTT CCT GTC 900
901 ACT TTG AAA AAA CAA GGA ATT ATC AAC AAG AAT GCT TAT TCT TTA TAT TTG AAT TCT GCT 960
961 TCT GCT TCA TCT GGT ACC ATT ATT TTT GGT GGG GTT GAT AAT GCT AAA TAC ACT GGT AGT 1020
1021 TTG ACC GCA TTA CCA ATC ACT TCA TCC AAT GAA CTA AGA GTT CAA TTG AGT ACT ATT AAC 1080
1081 ATT GCT GGA ACC ACT GTT AGT GCT TCA ACT ACC CCA GTT TTG GAT TCA GGT ACT ACT CTT 1140
1141 ACT TAT TTT TCT CAA ACT ATT GCT GAT AAA TTG GCT GCT GCC GTT GGT GCC AAA TGG AAT 1200
1201 AGT TAT TAT CAA CTT TAT ACT TCT AGT TGT AAT CTT GCT GGA AAT ATT GTT TTC AAT TTT 1260
1261 GCT AAA GGG GTT ACT ATT TCG GTT CCA TTA TCA GAA TTT GTT CTT CAA GAT GGT AAT TCT 1320
1321 TGT TAT TTT GGT GTT AGT AGA GAT CTG GCC ACT ATT TTG GGG GAT AAT TTC TTG AGA AGA 1380
1381 GCT TAT GCA GTT TAT GAT CTT GAT GGG AAC ACC ATT CTG TTG GCT CAA GTC AAA TAC ACT 1440
1441 ACT TCT TCA AGT ATT TCT ACT TTA TAG agagaatgTtctgtgttctcgatTTTTgttagaatttttagtta 1511
1512 gatgatttaactatTTTTtatttttaaatgaataaacatacaattattattattgttattattatattgggactactaa 1591
1592 gacagtttaaatggttttcgattcaaaaacaaaaggcatagaaggctga 1641
```

SAP9:

(auf Chromosom 3)

```
1 ctttttttttttctattttgtctcacttctcaattgtgccaccaaatgagacaaaaacgaaaaagaaaaacaacaattaa 80
81 attaaaatataagtagtaaatggatttcccaaatttcaatttctaataacattttacaattcaatattctaacacttcttt 160
161 ttcttttcttagtggttgatttctttcttcacaaacaattgctatagatatattctttccatctgatttcttttcttttt 240
241 ttttttccacatat ATG AGA CTC AAT TCT GTT GCG TTA TTA TCG CTA GTA GCA ACA GCA CTT 302
303 GCT GCT AAG GCA CCT TTC AAA ATC GAC TTC GAA GTG CGT CGT GGG GAG TCC AAA GAT GAT 362
363 TTA TCC CCT GAA GAT GAT TCC AAT CCT CGA TTT GTT AAA AGG GAT GGT TCA TTG GAC ATG 422
423 ACT TTA ACC AAC AAA CAG ACT TTT TAT ATG GCC ACG TTG AAA ATT GGA TCT AAT GAA GAC 482
483 GAG AAT AGA GTG TTG GAA GAT ACC GGG TCT TCA GAT TTG TGG GTC ATG TCC CAC GAT TTA 542
543 AAA TGT GTT AGT GCC CCA ATT TCT AAA CGT AAC GAA CGA TCT TTC GGT CAT GGA ACT GGT 602
603 GTT AAA CTA AAT GAA AGA GAA TTA ATG CAG AAG AGA AAG AAT TTA TAT CAA CCA TCA AGA 662
663 ACC ATA GAA ACC GAC GAG GAA AAA GAA GCA CTG GAG AAG ATT CAC AAC AAA CTA TTT GGC 722
723 TTT GGC AGT ATT TAC TCC ACA GTT TAT ATC ACT GAA GGT CCA GGT GCA TAT TCA ACG TTC 782
783 TCC CCA TTG GTA GGA ACT GAG GGT GGT TCT GGT GGT AGT GGT GGT TCC AAT ACC TGT AGA 842
843 TCC TAT GGT TCA TTC AAT ACC GAA AAC TCA GAC ACA TTT AAA AAA AAC AAC ACT AAT GAT 902
903 TTT GAA ATT CAA TAC GCT GAT GAT ACC AGT GCC ATT GGT ATT TGG GGG TAC GAT GAT GTC 962
963 ACC ATA AGC AAC GTG ACT GTC AAA GAC CTT TCT TTT GCA ATT GCA AAC GAA ACA TCC TCT 1022
1023 GAT GTT GGT GTT TTG GGT ATT GGT TTG CCT GGA TTA GAG GTC ACT ACA CAA TTA CGT TAC 1082
1083 ACC TAC CAG AAC TTG CCT CTT AAA TTG AAA GCA GAT GGA ATT ATT GCA AAG TCC CTT TAT 1142
1143 TCC TTA TAT CTC AAT ACT GCC GAT GCT AAA GCC GGA TCT ATT TTA TTT GGT GCT ATT GAT 1202
1203 CAT GCT AAA TAT CAA GGT GAC TTG GTG ACT GTT AAA ATG ATG AGA ACG TAT TCA CAA ATT 1262
1263 AGC TAC CCA GTG AGA ATA CAA GTC CCA GTA CTT AAA ATT GAC GTT GAA AGC AGC AGC GGC 1322
1323 AGT ACT ACC AAC ATT TTG TCA GGT ACC ACG GGT GTT GTT TTG GAT ACC GGT TCA ACT TTA 1382
1383 TCG TAT GTT TTC AGC GAC ACT TTG CAA CTG TTG GGA AAA GCT TTA AAT GGT CAA TAC TCG 1442
1443 AAT TCA GTT GGC GCT TAC GTA GTC AAC TGT AAC TTG GCC GAC TCC AGC AGA ACA GTC GAC 1502
1503 ATA GAA TTT GGT GGT AAC AAA ACC ATT AAA GTC CCA ATT TCT GAT TTG GTT TTG CAA GCT 1562
1563 AGT AAA TCA ACA TGT ATT TTG GGT GTT ATG CAA CAA TCG TCA AGC TCG TCG TAC ATG TTG 1622
1623 TTT GGA GAC AAT ATC TTG AGA AGT GCT TAC ATT GTT TAT GAT CTT GAC GAC TAT GAA GTA 1682
1683 AGT TTA GCT CAA GTG TCT TAT ACC AAC AAG GAA TCG ATT GAA GTC ATT GGT GCT AGT GGT 1742
1743 ATC ACT AAC AGT TCG GGT TCA GGA ACA ACA TCT TCA TCT GGC ACC TCT ACC AGT ACC AGC 1802
1803 ACA CGT CAT TCA GCT GGA AGT ATA ATT TCA AAT CCT GTG TAT GGG TTG TTG CTT TCG CTT 1862
1863 TTG ATA TCC TAC TAT GTT TTG GTT TAA ataagaagagaaaacttagagtgggttattatcccacctggctca 1933
1934 ttgttctatgcttattatctgattatgaggtaaccgtagctagatactgcgttcgtatcatttttacgactttcatc 2013
2014 gatattgttccattttttcatttattatatacatttacacacacatatatatatatttccgaaataatagaggttttat 2093
2094 tatcaactgaaattgaacaaaaa 2117
```

Elongationsfaktor Ib (EFBI):

1 acaccaacacatcacaaccaatacata ATG TCA TTC TCA GAT TTC TCT AAA GTC GAA TCT ATC AAG 67
→
68 TCA TTG AAC GAA TTC TTG GCT GAC AAA TCA TAC ATT GAT GG gtaagttttatTTTTTTtagtattt 133
134 tgtattattagttttgatctcatttcattttggaaattgccattgccatagggatgtctctaaatggaatatacctaattg 213
214 attcatagagagtccaattacacaatgtgatggaattctaattgtatccgggtgattttattttattttattataaatgat 293
294 gatctcaatctttggctccgtgtttatgagggtggcctcaagaccaccgcatgagtgacaaagaagatttaaatcttatat 373
374 ctgacaataatagagttatttcaatgagacaattgattttacaattactgactacaggaataaacaataataaaacga 453
454 tatactaacaatgtttgatag T ACT ACT GCC ACT CAA GCT GAT GTC ACT GTC TAC AAA GCT TTC 516
517 CAA AAG GAA TTC CCA CAA TTC ACC AGA TGG TTC AAC CAC ATT GCT TCA TTC ACT GAA GAA 576
577 TTC GAA GAC TTG CCA GCC GGT AAA GCC CCA GCC GCT TCT GGT TCT GCT GCT GCC GCT GCT 636
637 GAA GAA GAA GAT GAC GAA GAT GTC GAC TTG TTC GGT TCT GAT GAT GAA GTT GAT GAA GAA 696
697 GCT GAA AAA TTG AAG CAA CAA AGA TTA GCT GAA TAC GCT GCT AAG AAG GCT GCT AAA GGT 756
757 CCA AAA CCA GCT GCC AAA TCT ATT GTC ACC TTG GAT GTC AAA CCA TGG GAT GAT GAA ACT 816
817 GAT TTG GAT GAA TTA TTG ACC AAC GTC AAA GCT ATC GAA ATG GAA GGT TTG ACT TGG GGT 876
877 GCT CAC CAA TGG ATT CCA GTT GGT TTC GGT ATT AAA AAA TTA CAA ATT AAC TTG GTT GTT 936
←
937 GAA GAT GCT TTA GTC TCA TTG GAT GAC TTA CAA GCT GCT GTT GAA GAA GAT GAA GAC CAC 996
997 GTC CAA TCT ACT GAT ATT GCT GCT ATG CAA AAA TTG TAA gtttcctttctccatttctattttggag 1063
1064 atctttttaataacagtaaatatTTTTTTTTgtccattattattatctgtagtgtctacagagttatacagcttgtgtgtg 1143
1144 tctttagttgactcttggtatgtgcaa 1170

7.4 Gesamtheit der bearbeiteten Proben

In der folgenden Tabelle sind alle bearbeiteten Proben aufgeführt. Neben den mikrobiologischen und den rT-PCR-Ergebnissen sind auch der Entnahme- und Bearbeitungstag, sowie die Entnahmetechnik, der Entnahmeort und die ursprüngliche Probennummer zu ersehen.

Tabelle 14: Gesamtheit der bearbeiteten Proben (n.a.: nicht analysiert; n.b.: nicht bekannt)

Probennummer	Kulturergebnis	EFBI	SAPs	Entnahmetag	Bearbeitungstag	Entnahmetechnik	Entnahmeort	Ursprüngliche Nummer
1	n.a.	-	-	25.10.1999	25.10.1999	Impföse	GH	n.b.
2	<i>C.albicans</i>	-	1,4	18.11.1999	19.11.1999	Impföse	GH	n.b.
3	n.a.	-	-	11.11.1999	29.11.1999	Impföse	GH	n.b.
4	n.a.	-	-	02.12.1999	09.12.1999	Impföse	GH	n.b.
5	<i>C. albicans</i>	-	-	16.12.1999	10.01.2000	Impföse	GH	n.b.
6	n.a.	-	-	13.01.2000	17.01.2001	Impföse	GH	n.b.
7	<i>C. albicans</i>	-	-	27.01.2000	28.01.2000	Impföse	GH	n.b.
8	n.a.	-	-	17.02.2000	22.02.2000	Impföse	GH	n.b.
9	n.a.	-	-	17.02.2000	22.02.2000	Impföse	GH	n.b.
10	n.a.	+	4	07.02.2000	01.03.2000	Impföse	Dr. Schelling	Sl 2
11	n.a.	-	-	unbekannt	03.03.2000	Impföse	Dr. Schelling	Sl 7
12	n.a.	-	-	unbekannt	03.03.2000	Impföse	Dr. Schelling	Sl 10
13	n.a.	+	1,4	18.04.2000	25.04.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 16
14	n.a.	-	-	18.04.2000	25.04.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 17
15	<i>C. albicans</i>	+	-	29.03.2000	11.05.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 3
16	<i>C. albicans</i>	-	-	12.04.2000	11.05.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 12
17	<i>C. albicans</i>	+	1,4,8	22.05.2000	01.06.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 35
18	<i>C. albicans</i>	-	4,8	30.05.2000	01.06.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 45
19	<i>C. albicans</i>	-	-	03.07.2000	15.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 41
20	<i>C. albicans</i>	+	4,5,9	15.06.2000	15.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 43
21	<i>C. albicans</i>	-	8	11.05.2000	19.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 21
22	<i>C. albicans</i>	+	-	05.06.2000	21.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 36
23	<i>C. albicans</i>	+	6	09.06.2000	21.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 37
24	negativ	-	-	25.07.2000	21.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 48
25	<i>C. albicans</i>	+	1,4	17.07.2000	21.09.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 67
26	n.a.	+	1	18.05.2000	05.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 32
27	<i>C. albicans</i>	-	6	14.06.2000	05.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 40
28	n.a.	-	4	02.08.2000	05.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 71
29	<i>C. albicans</i>	-	4	12.09.2000	05.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 83
30	n.a.	-	-	24.05.2000	05.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 4
31	n.a.	-	-	24.05.2000	06.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 5
32	negativ	-	-	13.04.2000	06.10.2000	Impföse	GH	GH 8
33	<i>C. albicans</i>	-	-	22.05.2000	06.10.2000	Impföse	Dr. Schulze	Sz 33
34	<i>C. albicans</i>	-	-	10.07.2000	24.02.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 63
35	n.a.	-	-	11.07.2000	24.02.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 64
36	n.a.	+	2,9	09.05.2000	16.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 23

37	n.a.	+	-	n.b.	16.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 9
38	n.a.	+	6	n.b.	16.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 47
39	n.a.	+	1	n.b.	16.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 82
40	n.a.	-	-	15.05.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 26
41	<i>C. albicans</i>	-	-	19.05.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 27
42	n.a.	-	-	15.05.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 28
43	n.a.	-	-	16.05.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 31
44	n.a.	-	-	09.06.2001	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 46
45	n.a.	-	-	10.08.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 60
46	n.a.	+	5	14.08.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 61
47	n.a.	-	-	n.b.	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 62
48	n.a.	-	-	17.07.2000	17.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 66
49	<i>C. albicans</i>	+	1,4	10.07.2000	30.05.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 42
50	<i>C. albicans</i>	-	6	25.05.2000	30.05.2001	Impföse	Bielefeld	B 1
51	<i>C. albicans</i>	-	-	09.05.2001	30.05.2001	Impföse	GH	GH 3
52	<i>C. albicans</i>	+	-	25.05.2000	30.05.2001	Impföse	GH	GH 26
53	<i>C. albicans</i>	+	1,4,6,9	06.04.2000	05.06.2001	Impföse	Bielefeld	B 2
54	n.a.	-	-	18.05.2000	05.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 32
55	n.a.	-	-	n.b.	05.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 38
56	<i>C. albicans</i>	-	-	27.07.2000	05.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 52
57	negativ	-	-	20.04.2000	05.06.2001	Impföse	GH	GH 12
58	negativ	-	-	05.06.2001	05.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 100
59	<i>C. albicans</i>	-	6	14.06.2000	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 40
60	n.a.	-	-	2000	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 39
61	<i>C. albicans</i>	+	1	03.07.2000	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 41
62	n.a.	-	-	2000	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 96
63	n.a.	-	-	13.11.2000	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 97
64	n.a.	-	-	13.11.2001	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 98
65	n.a.	-	-	06.06.2001	08.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 99
66	negativ	-	-	08.06.2001	09.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 101
67	<i>C. albicans</i>	-	2,6	08.06.2001	24.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 102
68	<i>C. albicans</i>	+	-	11.06.2001	22.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 103
69	<i>C. albicans</i>	-	5,8	12.06.2001	22.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 104
70	<i>C. albicans</i>	-	1,3,4,6,8,9	13.06.2001	30.06.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 105
71	<i>C. albicans</i>	-	2,3,5,6,9	20.06.2001	01.07.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 106
72	negativ	-	-	24.06.2001	n.b.	Impföse	Dr. Schulze	Sz 108
73	<i>C. albicans</i>	-	-	11.07.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 1
74	negativ	-	6	11.07.2001	18.07.2001	Spritze	GH KG	KG 2
75	negativ	+	4,5	11.07.2001	18.07.2001	Spritze	GH KG	KG 3
76	negativ	+	8,9	11.07.2001	02.08.2001	Spritze	GH KG	KG 4
77	negativ	-	3,4,8	11.07.2001	03.08.2001	Spritze	GH KG	KG 5
78	negativ	-	-	11.07.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 6
79	negativ	-	-	19.07.2001	n.b.	Spritze	GH S	S 7
80	negativ	-	-	19.07.2001	n.b.	Spritze	GH S	S 8
81	negativ	-	6,9	19.07.2001	03.08.2001	Spritze	GH S	S 9
82	<i>C. albicans</i>	-	1	10.07.2001	02.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 92
83	<i>C. albicans</i>	-	3,6	11.07.2001	27.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 94
84	n.a.	-	8	12.07.2001	04.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 115
85	<i>C. glabrata</i>	-	-	14.07.2001	26.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 93
86	<i>C. albicans</i>	+	1,3,6,8	18.07.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 7
87	negativ	-	-	18.07.2001	21.08.2001	Spritze	GH KG	KG 8
88	negativ	-	-	18.07.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 9
89	negativ	-	-	18.07.2001	25.08.2001	Spritze	GH KG	KG 10

90	negativ	-	-	18.06.2001	22.06.2001	Spritze	GH S	S 4
91	n.a.	-	-	05.07.2001	12.07.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 95
92	n.a.	-	-	n.b.	11.07.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 112
93	n.a.	-	-	n.b.	11.07.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 113
94	n.a.	-	-	n.b.	11.07.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 114
95	<i>C. albicans</i>	-	9	25.07.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 11
96	<i>C. albicans</i>	-	-	25.07.2001	22.08.2001	Spritze	GH KG	KG 12
97	negativ	-	-	25.07.2001	21.08.2001	Spritze	GH KG	KG 13
98	negativ	+	-	25.07.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 14
99	negativ	-	-	25.07.2001	n.b.	Spritze	GH S	S 10
100	n.a.	-	4,6,9	24.07.2001	30.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 85
101	n.a.	-	-	27.07.2001	28.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 88
102	n.a.	-	6,9	31.07.2001	02.09.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 89
103	n.a.	-	3,4,9	24.07.2001	31.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 86
104	n.a.	-	-	n.b.	07.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 87
105	n.a.	-	-	07.08.2001	n.b.	Impföse	Dr. Schulze	Sz 91
106	n.a.	+	1,2,3,6,8,9	26.07.2001	28.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 116
107	n.a.	-	-	09.08.2001	02.09.2001	Impföse	Dr. Deininger	De 8
108	n.a.	-	-	10.08.2001	n.b.	Impföse	Dr. Deininger	De 11
109	n.a.	-	-	02.08.2001	22.08.2001	Impföse	Dr. Deininger	De 4
110	n.a.	-	3,6	03.08.2001	23.08.2001	Impföse	Dr. Deininger	De 5
111	n.a.	-	-	10.08.2001	n.b.	Impföse	Dr. Deininger	De 9
112	n.a.	-	-	14.08.2001	22.08.2001	Impföse	Dr. Deininger	De 13
113	n.a.	-	-	13.08.2001	25.08.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 118
114	n.a.	-	-	n.b.	01.09.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 119
115	negativ	+	-	02.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 15
116	negativ	+	-	02.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 16
117	negativ	+	-	02.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 17
118	negativ	+	-	02.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 18
119	negativ	+	-	09.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 19
120	negativ	-	-	22.08.2001	03.09.2001	Spritze	GH KG	KG 20
121	<i>C. albicans</i>	-	-	22.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 21
122	negativ	+	-	22.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 22
123	negativ	+	-	22.08.2001	09.09.2001	Spritze	GH KG	KG 23
124	negativ	+	-	22.08.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 24
125	negativ	-	2,3,5,6	22.08.2001	07.09.2001	Spritze	GH KG	KG 25
126	n.a.	+	6	20.08.2001	08.09.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 120
127	n.a.	+	1,2	20.08.2001	10.10.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 133
128	n.a.	-	-	20.08.2001	n.b.	Impföse	Dr. Deininger	De 14
129	n.a.	-	-	20.08.2001	09.01.2002	Impföse	Dr. Deininger	De 15
130	n.a.	-	-	21.08.2001	n.b.	Impföse	Dr. Deininger	De 16
131	n.a.	-	-	27.08.2001	11.01.2002	Impföse	Dr. Schulze	Sz 122
132	n.a.	+	5	28.08.2001	12.10.2001	Impföse	Dr. Deininger	De 21
133	negativ	+	-	01.08.2001	09.01.2002	Spritze	GH S	S 11
134	n.a.	-	1,9	28.08.2001	19.10.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 123
135	n.a.	-	-	11.09.2001	12.01.2002	Impföse	Dr. Schulze	Sz 132
136	n.a.	-	-	28.08.2001	n.b.	Impföse	Dr. Deininger	De 20
137	n.a.	-	-	n.b.	09.01.2002	Impföse	Dr. Deininger	De 30
138	negativ	+	-	01.08.2001	19.10.2001	Spritze	GH S	S 12
139	negativ	-	-	01.08.2001	26.10.2001	Spritze	GH S	S 13
140	negativ	-	-	n.b.	n.b.	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 1
141	<i>C. albicans</i>	-	-	n.b.	09.01.2002	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 2
142	negativ	-	-	n.b.	06.01.2002	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 3

143	negativ	-	-	n.b.	08.01.2002	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 4
144	<i>C. albicans</i>	-	-	n.b.	06.01.2002	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 5
145	<i>C. albicans</i>	-	-	n.b.	11.01.2002	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 7
146	<i>C. albicans</i>	-	-	n.b.	11.01.2002	Spritze	Dr. Jauernik	Ja 8
147	n.a.	-	-	04.05.2001	09.01.2001	Impföse	Dr. Schulze	Sz 124
148	n.a.	-	-	04.09.2001	12.01.2002	Impföse	Dr. Deininger	De 24
149	negativ	+	-	12.12.2001	14.01.2002	Spritze	GH KG	KG 26
150	n.a.	+	1,4,8	06.12.2001	15.01.2002	Spritze	GH KG	KG 27
151	negativ	-	1	08.11.2001	15.01.2002	Spritze	GH KG	KG 28
152	negativ	-	-	12.12.2001	14.01.2002	Spritze	GH KG	KG 29
153	negativ	-	-	09.01.2002	17.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 210
154	negativ	-	-	n.b.	17.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 211
155	<i>C. albicans</i>	+	-	10.01.2002	18.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 212
156	<i>C. albicans</i>	-	-	10.01.2002	17.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 213
157	<i>C. albicans</i>	+	4,8	14.01.2002	17.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 214
158	<i>C. albicans</i>	-	-	16.01.2002	25.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 215
159	<i>C. albicans</i>	-	-	17.01.2002	25.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 216
160	negativ	-	-	18.01.2002	n.b.	Spritze	Dr. Schulze	Sz 217
161	<i>C. albicans</i>	-	-	21.01.2002	22.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 218
162	<i>C. albicans</i>	-	-	21.01.2002	22.01.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 201
163	negativ	+	1,3,5	06.12.2001	18.01.2002	Spritze	GH KG	KG 30
164	n.a.	-	-	06.12.2001	18.01.2002	Spritze	GH KG	KG 31
165	negativ	-	-	19.12.2001	18.01.2002	Spritze	GH KG	KG 32
166	<i>C. albicans</i>	+	-	24.01.2002	n.b.	Spritze	GH KG	KG 33
167	negativ	+	-	29.11.2001	n.b.	Spritze	GH KG	KG 34
168	<i>C. albicans</i>	-	-	22.01.2002	n.b.	Spritze	Dr. Schulze	Sz 202
169	negativ	-	-	23.01.2002	n.b.	Spritze	Dr. Schulze	Sz 203
170	<i>C. albicans</i>	-	-	n.b.	n.b.	Spritze	Dr. Schulze	Sz 204
171	<i>C. albicans</i>	-	-	24.01.2002	03.02.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 205
172	<i>C. glabrata</i>	-	-	24.01.2002	n.b.	Spritze	Dr. Schulze	Sz 206
173	negativ	-	-	24.01.2002	03.02.2002	Spritze	Dr. Schulze	Sz 207
174	<i>C. albicans</i>	-	-	28.01.2002	n.b.	Spritze	Dr. Schulze	Sz 209

8 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. E.R. Weissenbacher für die Bereitstellung des Themas und die tatkräftige Unterstützung. Mein großer Dank gilt auch gleichermaßen Herrn Prof. Spitzbart für das Geben von Hilfestellungen und das unermüdliche Korrekturlesen. Ausgesprochener Dank gilt meinen Laborkollegen, insbesondere Frau Vera Tolbert, die mit Ihrer freundlichen Art stets eine Stütze während meiner Labortätigkeit war und von der ich viel molekularbiologisches Know-How lernen konnte.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Herrn Andreas Brachmann, Institut of National Health, Washington, der mir mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft das molekularbiologische Arbeiten beigebracht hat und bei wirklich jedem Problem mit Rat und sehr viel Tat zur Seite stand. Er war die wissenschaftliche Seele dieser Arbeit.

Dank gilt auch Herrn Dr. Schaller, Klinik für Dermatologie der Universität München, der sein Wissen bezüglich rT-PCR bei *Candida albicans* bereitwillig weitergab.

Für die Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Vera Zietemann (GSF) bedanken und für Hilfe bei der optischen Gestaltung bei Jan Mirus.

Dank gilt neben allen meinen Freunden, die mich immer unterstützen und gut beraten, besonders Frau Daniela Micklich.

Zuletzt möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Frau Katharina Avşar und Herrn Ayhan Avşar meinen tiefen Dank nicht nur für das Ermöglichen meiner akademischen Ausbildung aussprechen.

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Korkut Murat Avşar
Wohnort: Schachblumenweg 24
81377 München
Geburtstag : 17.06.1973
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Kinder: 1 Tochter

Schulbildung

1983 –1984 Dillmann-Gymnasium, Stuttgart
1984 –1993 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München
09.07.1993 Abitur

Zivildienst

08/1993- 11/1994 Krankenpflegehelfer, Abdominalchirurgie, Klinikum
Rechts der Isar/München

Studium

Ludwig-Maximilians-Universität München
20.03.1997 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
24.03.1998 I. Staatsexamen (Note: gut)
06.09.2000 II. Staatsexamen (Note: gut)
16.04.2002 III. Staatsexamen (Note: gut)

Berufliche Praxis

Praktisches Jahr:

- 1.Tertial: Innere Medizin, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin/Hamburg
- 2.Tertial: Chirurgie, Krankenhaus Harlaching/München
- 3.Tertial: Gynäkologie, Klinikum Großhadern/München
- Innere Medizin-Tertial in Hamburg vom Prüfungsamt nicht anerkannt:
- Wiederholungstertial: Innere Medizin, I. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern/München

07/2002- 12/2003 Arzt im Praktikum Asklepios Lungenfachklinik Gauting (Prof.Häußinger); Abteilung Onkologie

Seit 01.01.2004 Assistenzarzt Asklepios Lungenfachklinik Gauting (Prof. Dr. Häußinger); Abteilung allgemeine Pneumologie

Vortrag im Rahmen der Dissertation:

"Proteinasemuster bei Kandidosen"

VII. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Infektionen und Infektionsimmunologie in der Gynäkologie und Geburtshilfe (European Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology), Juni 2003