

Surina Zakikhani  
Dr. med.

### **Introns im 18S rRNA-Gen von *Histoplasma*, *Paecilomyces* und *Exophiala***

geboren am 25.04.72 in Teheran/Iran  
Reifeprüfung am 08.07.1992 in Lindau am Bodensee  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/1993 bis WS 1998/1999  
Physikum am 30.08.1994 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr im Städtischen Klinikum Pforzheim  
Staatsexamen am 04.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene  
Doktorvater: Priv. Doz. Dr. med. R. Kappe

Nachweis klinischer Mykosen und Identifizierung von Pilz-Arten erfolgen zunehmend auf molekularer Ebene. Zielstruktur ist hierbei oft die 18S rDNA, die für die kleine ribosomale Untereinheit kodiert. In der vorliegenden Arbeit wurden Gene des ribosomalen Gen-Clusters ausgewählter medizinisch relevanter Pilze hinsichtlich Variabilität und Eignung zur Species-Identifizierung und Stamm-Typisierung untersucht.

Nachdem bei der Amplifikation eines 18S rDNA-Fragmentes von *Histoplasma capsulatum* unerwartet große Produkte aufgetreten waren, wurde die 18S rDNA von 67 Pilz-Species auf eine derartige Verlängerung des Amplifikats mittels PCR untersucht. Neben *H. capsulatum* traten noch bei *Exophiala dermatitidis* und *Paecilomyces variotii* verlängerte Amplifikationsprodukte auf, deren Ursache zunächst unbekannt war. Durch Sequenzanalyse der verlängerten DNA wurden Einschübe in die bekannte Sequenz lokalisiert.

Von *H. capsulatum* wurden elf Stämme hinsichtlich dieser Einschübe untersucht. Von der Varietät *farciminosum* besaßen 4 von 6 Stämmen einen Einschub, der bei den 4 Stämmen in der Sequenz identisch war (Länge 403 bp). Von der Varietät *capsulatum* besaß 1 von 3 Stämmen einen Einschub (Länge 408 bp). Die 2 untersuchten Stämme der Varietät *duboisii* besaßen keinen Einschub. Von 5 amplifizierten Stämmen von *P. variotii* besaß 1 Stamm ein verlängertes Amplikon, der gefundene Einschub hatte eine Länge von 365 bp. Von *E. dermatitidis* wurde ein Genabschnitt der 18S rDNA von 8 Stämmen amplifiziert. 4 Stämme besaßen ein verlängertes Amplikon. Von diesen wurde das Amplikon zweier Stämme genauer untersucht. Diese 2 Stämme waren aus dem Sputum eines 25-jährigen Mukoviszidose-Patienten im Abstand zweier Jahre isoliert worden. Die Sequenzanalyse ergab 2 Einschübe bei

jedem dieser Stämme (Längen: erster Einschub 542 bp und zweiter Einschub 426 bp), die jeweils in ihrer Basensequenz bei beiden Stämmen vollkommen identisch waren.

Die Einschübe wurden hinsichtlich ihrer Nukleotid-Sequenz, ihrer Sekundärstruktur, offener Leserahmen und phylogenetischer Verwandtschaft untersucht, mit Introns aus der Datenbank verglichen und dadurch als Introns identifiziert. Alle einzelnen Introns ließen sich der Gruppe IC1 zuordnen. Die zusätzlichen Introns bei *E. dermatitidis* ließen sich keiner bekannten Intron-Gruppe zuordnen.

Amplifikation, Sequenzierung und Hybridisierung der 18S rDNA von *H. capsulatum*-Stämmen der Varietät *capsulatum* (drei Stämme), *dubosii* (zwei Stämme) und *farcimosum* (drei Stämme) zeigten bei zwei Stämmen der Varietät *farcimosum* (CBS 205.35 und CBS 478.64) eine Abweichung in der Sequenz der 18S rDNA in einem Basenpaar an der Position 114 (Referenzgen *Saccharomyces cerevisiae*). An dieser Position war die Base Cytosin durch Guanin ersetzt. Diese Untersuchungen bestätigen die taxonomische Zuordnung der Varietäten *dubosii* und *farcimosum* als Varietäten der Species *H. capsulatum*.

Weiterhin wurde die 18S rDNA des *P. variotii*-Stammes CBS 339.51 vollständig sequenziert, da er als einziger ein Intron besaß und zudem im Gegensatz zu vier weiteren *Paecilomyces*-Stämmen mit einem für *Aspergillus fumigatus* spezifischen Oligonukleotid AF hybridisierte. Die 18S rDNA-Sequenz dieses Stammes wich in 22 bp von einer publizierten *P. variotii* - Sequenz ab. Eine derart hohe Variabilität innerhalb der 18S rDNA einer Art war bislang nicht bekannt.

Schließlich wurden die ITS1-Regionen von 3 *C. albicans*-Patienten-Stämmen sequenziert und mit 4 publizierten Sequenzen verglichen. Es fanden sich minimale Abweichungen von höchstens einem Basenpaar. Die ITS1-Region ist bei *C. albicans* wohl zur Species-Identifizierung, nicht jedoch zur Typisierung geeignet.

Von *H. capsulatum* wurde die ITS1-Region von 5 Stämmen sequenziert (ein Stamm *H. capsulatum*, ein Stamm *H. dubosii* und 3 Stämme *H. farcimosum*). Die ITS1-Sequenzen unterschieden sich bei den Varietäten.

Insgesamt eignen sich die Gene des ribosomalen Gen-Clusters als Zielstruktur für die molekulare Diagnostik. Introns treten hier selten auf und stören bei geeigneter Primerwahl kaum. Zu Nachweis und Identifizierung von Pilzen eignen sich sowohl die Gene für die ribosomalen Untereinheiten als auch die Spacer-Regionen.