

**Thema: Molekulare Systematik und Evolution der Spezies der Familie
Arthrodermataceae (Dermatophyten)**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach**

Mikrobiologie

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

**Frau Dr. rer. nat. Yvonne Gräser
geboren am 19. 09. 1960 in Bad Saarow**

Präsident: Prof. Dr. h. c. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

eingereicht am: März 2001

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. rer. nat. Johannes Müller**
- 2. PD Dr. med. Hans-Christian Korting**

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	3
I. Ausführliche Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse	4-36
1. Einführung	4-6
1.1 Der Ursprung der Dermatophytose	4-6
2. Beschreibung der Dermatophyten	6-14
2.1 Begriffsdefinitionen	6
2.2 Das taxonomische System der Pilze	7-8
2.3 Die klassische Taxonomie der Familie der <i>Arthrodermataceae</i>	8-10
2.3.1 Morphologie und Physiologie	10-12
2.3.2 Natürliche Ökologie, Epidemiologie und Krankheitsbilder	12-14
2.3.3 Problemstellung	14
3. Methodik	15-20
3.1 Anwendung molekularer Methoden zur Evaluierung der Taxonomie und Phylogenie der Dermatophyten	15-17
3.2 Das ribosomale Operon, einschließlich der ITS als phylogenetischer Marker	17-19
3.3 Weitere Marker, um Speziesgrenzen bei den Dermatophyten festzulegen	19-20
4. Ergebnisse und Diskussion	20-35
4.1 Die neue Systematik der Dermatophyten	20-31
4.1.1 Die anamorphen Gattungen <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> und <i>Epidermophyton</i>	20-22
4.1.2 Die anthropophilen und zoophilen Dermatophytenspezies	23-31
4.1.2.1 Der <i>Trichophyton mentagrophytes</i> / <i>T. tonsurans</i> / <i>T. erinacei</i> Komplex	23-28
4.1.2.2 Der <i>Microsporum canis</i> Komplex	28-30
4.1.2.3 Der <i>Trichophyton rubrum</i> Komplex	30-31
4.2 Die Evolution innerhalb der Gattung <i>Arthrodermataceae</i>	31
4.3 Applikation für die medizinisch-mykologische Diagnostik und Epidemiologie	31-35
5. Abschließende Diskussion und Ausblick	35-36
II. Publikationen zur ausführlichen Zusammenfassung	37-39
III. Verzeichnis sämtlicher Publikationen	40-43
IV. Verzeichnis sämtlicher Abstrakt und Kongreßbeiträge	44-50

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	„amplified fragment length polymorphism“
ITS	„internal transcribed spacer region“
MT	„mating type“
mtDNA	mitochondriale DNA“
PCR	„polymerase chain reaction“
SSCP	„single strand conformation polymorphism“
RFLP	„restriction fragment length polymorphism“
RAPD	„random amplified polymorphic DNA“
rDNA	ribosomale DNA

I. Ausführliche Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse

1. Einführung

1.1 Der Ursprung der Dermatophytose

Dermatophyten sind keratinophile Pilze, d.h. sie besiedeln und infizieren die Haut und ihre Anhangsgebilde (Haare, Nägel, Schuppen) bei Mensch und Tier. Keratinophile Pilze, wie *Achorion schoenleinii* [Schönlein, J.L., 1839, Arch. Anat. Physiol. Med. 82; Remark, R., 1845, Dissertation, Hirschwald] und *Trichophyton tonsurans* [Malmsten, P.H., 1845, Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. (J. Muller) 1845-1848; 1-19, 1 pl. Stockholm, 1845, gr.8] gehören zu den ersten humanpathogenen Pilzspezies, die vor ca. 150 Jahren beschrieben wurden. In den folgenden 70 Jahren wurde dann die Mehrheit, der heute existierenden Dermatophytenarten beschrieben.

Auch *Microsporum audouinii*, ein humanpathogener Vertreter der Gattung *Microsporum* wurde bereits 1843 von Gruby [Gruby, M., 1843, Comp. rend. Acad. d. Sc. 17, 301] eingeführt. Die am intensivsten untersuchten Arten gehören zur Gattung *Trichophyton*, da viele von ihnen humanpathogen sind und kutane Infektionen hervorrufen können, die man als Tinea, Favus oder Onychomykose bezeichnet. Die Gattung *Trichophyton* wurde 1848 von Malmsten [Malmsten, P.H., 1845, Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. (J. Muller) 1845-1848; 1-19, 1 pl. Stockholm, 1845, gr.8] eingeführt, kurz nach Gruby's Entdeckung, 1841 [Gruby, D., 1841, C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 13, 309-312], daß Hautinfektionen pilzlicher Natur sein können. Mit der Beschreibung von *Achorion schoenleinii* durch Remark, 1845 [Remark, R., 1845, Dissertation, Hirschwald], von *Trichophyton tonsurans* durch Malmsten, 1848 [Malmsten, P.H., 1845, Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. (J. Muller) 1845-1848; 1-19, 1 pl. Stockholm, 1845, gr.8] und *Microsporum mentagrophytes* durch Robin, 1853 [Robin, C., 1853, Masson, Paris 704 pp.] waren die wichtigsten Erreger der kutanen Mykosen schon damals bekannt. Diese Richtung, des erst später eingeführten Fachgebietes „Medizinische Mikrobiologie“ zeigte wegen der leichteren Zugänglichkeit und besseren Beobachtungsmöglichkeiten bereits lange vor Koch's und Pasteur's Zeiten signifikante Entwicklungen.

Kein Pilz wurde zu diesem Zeitpunkt auf künstlichen Nährböden kultiviert. Die Identifizierung der Taxa erfolgte ausschließlich an Hand der klinischen Krankheitsbilder. Erst 1890 wurde mit der Kultivierung der Pilze zwecks Typisierung begonnen. Das war der Ausgangspunkt für die Beschreibung der meisten Dermatophytenarten auf Grundlage kultureller und morphologischer Merkmale. Es war Sabouraud, der die ätiologischen Erreger solcher Hautinfektionen erstmalig systematisch auf künstlichen Medien anzüchtete

[Sabouraud, R., 1910, Masson, Paris 855 pp.]. Er führte viele zusätzliche diagnostische Kriterien ein, die noch heute benutzt werden.

Um die Jahrhundertwende war jedoch noch nicht klar, daß Stämme, die von Mensch oder Tier isoliert wurden nach nur wenigen Passagen umfassende phänotypische Veränderungen zeigen konnten: Häufig verloren diese Isolate nach nur einer Subkultivierung ihre typische Morphologie und zeigten auf Grund der fakultativen Produktion von Metaboliten Veränderungen in für die Identifizierung relevanten Kriterien [7]. Die Anzahl der Dermatophytenarten und -varianten stieg exponentiell auf über hundert um 1930 [Dodge CW., 1935, Eds. C.V. Mosby Co., St. Louis]. Die Typisierung von Pilzstämmen und die Aufbewahrung von Stammsammlungen in Institutionen wie z.B. dem CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande) waren zum damaligen Zeitpunkt noch keine Routinemethode. Aus diesem Grund ist leider von den Pilzspezies, die vor 1920 beschrieben wurden, kein Originalmaterial (Typstämme) mehr verfügbar, sondern es existieren nur sekundäre Isolate (Stämme der gleichen Spezies, die aber keine Typstämme sind).

Ende der 50iger Jahre führten Georg [Georg, L.K., 1957, 11th Congr. Dermatol., Stockholm] und später Shadomy & Philpot [Shadomy, H.J. & Philpot, C.M., 1980, Am. J. Clin. Pathol. 74, 197-201] physiologische Merkmale zur Identifizierung der häufigsten humanpathogenen Dermatophytenspezies ein. Ihr System wurde dann von Kane et al. [Kane, J. et al., 1997, Star Publ., Belmont, USA] ausgefeilt und auf weitere Arten ausgedehnt. Auf Grund der geringen Diskriminierungsfähigkeit dieser Technik blieben jedoch vor allem die vorhandenen Kollektionsstämme bis vor kurzem schwer bestimmbar, d.h. einer Spezies zuzuordnen.

Die Entdeckung von Teleomorphverbindungen (sexuelle Reproduktionsform der Pilze, verbunden mit der Ausbildung charakteristischer Merkmale; siehe auch Abb. 2, Pkt. 2.2 und 2.3) lieferte in den 60er Jahren einen Durchbruch für die Artbestimmung, der auch entscheidend zum Verständnis der Biologie der Dermatophyten beitrug. Sie gehören seitdem zur Familie der *Arthrodermataceae* der Ordnung der *Onygenales* [Abb. 1, Currah, R.S., 1985, Mycotaxon 24, 1-216, Weitzman, I. et al., 1986, Mycotaxon 25, 505-518].

Biochemische und immunologische Untersuchungen auf Basis von Fettsäure- und Enzymmustern brachten dagegen keine Verbesserungen hinsichtlich der Differenzierung der Dermatophyten [Jones, M.G. & Noble, W.C., 1981, J. Bacteriol. 50, 577-583 und 1982, J. Gen. Microbiol. 128, 1101-1107].

Die ersten, in den 80er Jahren durchgeführten molekularen Studien konnten zeigen, daß die humanassoziierten Spezies sehr eng miteinander verwandt sind [Davison, F.D. et al., 1980, J. Gen. Microbiol. 118, 465-470].

Später wurden erst molekularbiologische Methoden verfügbar, die im Gegensatz zu o.g. in der Lage waren, Stämme bis auf Genotypniveau zu differenzieren, indem Unterschiede direkt auf DNA/Sequenz-Ebene (Charakterdaten, qualitative Analyse möglich!) erfaßt

wurden und nicht ausschließlich über diskrete Daten (paarweise Distanzen, nur quantitative Analyse möglich!) wie sie Temperaturschmelzkurven, die bei der DNA-DNA-Hybridisierung entstehen, darstellen. Bei den Dermatophyten wurden dafür Restriktionsfragmentanalysen (RFLP) der mitochondrialen (mt) DNA [Kawasaki, M. et al., 1990, Mycopathologia 112, 173-177], DNA-Fingerprinting-Techniken [1, Mochizuki, T. et al., 1997, Mycoses 40, 405-409] und die Sequenzierung von ribosomalen Genen [2, Harmsen, D. et al., 1995, J. Med. Vet. Mycol. 33, 299-303, Leclerc, M. et al., 1994, J. Med. Vet. Mycol. 32, 331-341] genutzt (s. auch Pkt. 3.2 und 3.3). Diese Methoden trugen deutlich zum Verständnis der Biodiversität und Ökologie der Dermatophyten bei und ermöglichten eine natürlichere, da phylogenetische Systematik.

2. Beschreibung der Dermatophyten

2.1 Begriffsdefinitionen

Unter dem Begriff "Dermatophyten" werden aus klinischer Sicht nur die zu den Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* der Familie der *Arthrodermataceae* gehörenden Pilzspezies, die klinisch oder subklinisch auf dem Menschen und anderen warmblütigen Tieren vorkommen können, zusammengefaßt. In diesem Sinne umschließt diese Definition nur einen Teil der Familie der *Arthrodermataceae* und erweist sich somit als ungeeignet, diese Pilzgruppe zu beschreiben, denn systematisch gehören auch die ausschließlich im Boden lebenden, geophilen *Microsporum*- und *Trichophyton*arten dazu. Deshalb wird in den folgenden Ausführungen der Begriff "Dermatophyten" als Synonym für alle Spezies der Familie der *Arthrodermataceae* verwendet werden.

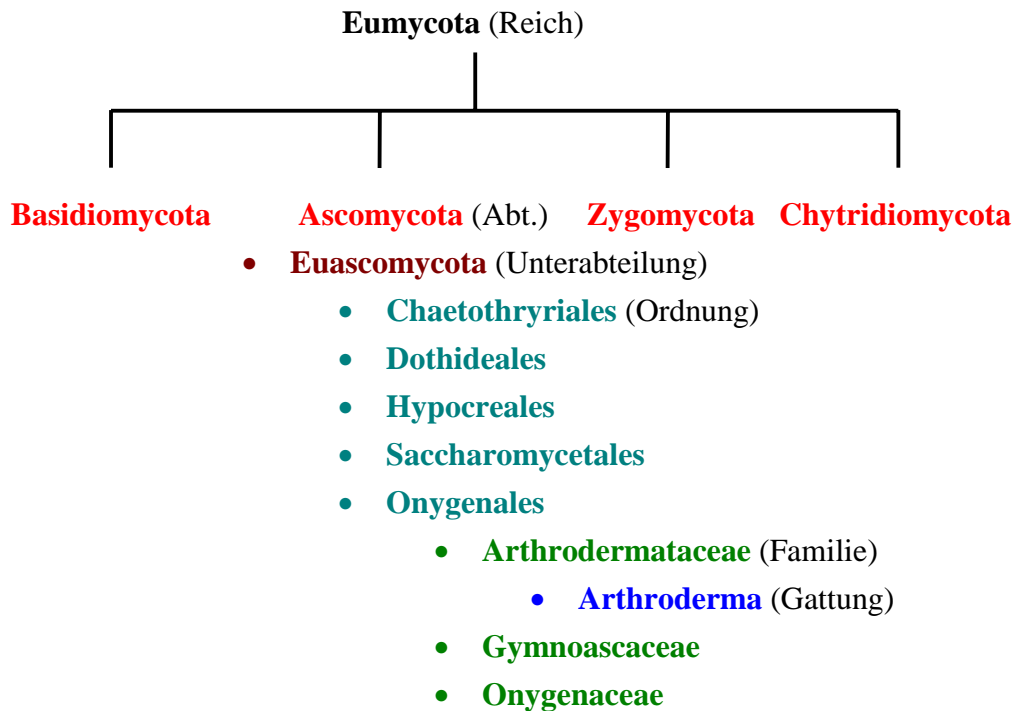
Als "Dermatophytose" werden alle, durch Spezies der Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton* hervorgerufenen Infektionen der Haut und/oder ihrer Anhangsgebilde bezeichnet. Sie bilden eine klinische Entität. Klinische Typen oder Subentitäten der Dermatophytose werden mit "Tinea" und einen zusätzlichen Term, der die infizierte Körperstelle beschreibt, bezeichnet [Odds, F.C. et al., 1992, J. Med. Vet. Mycol. 30, 1-10]. Die derzeit häufigsten Infektionen in dieser Nomenklatur sind Tinea pedis, Tinea unguium (Onychomykose), Tinea capitis und Tinea corporis. Der Begriff „Dermatomykose“ ist dagegen eine Sammelbezeichnung, wenn durch einen Pilznachweis, z.B. im Nativpräparat, die mykogene Natur der Hautkrankheit sehr wahrscheinlich ist, entspricht jedoch nicht den internationalen terminologischen Regelungen.

Die Dermatophytose ist eine der häufigsten Kommunikationskrankheiten in der Welt. Über 500 Millionen Dollar werden jährlich weltweit für Antimykotika ausgegeben und der größte Teil davon zur Therapie dieser Pilzinfektion [Walsh, T.J. & Fromtling, R., 1990, Med. Mycol. Soc. Am. Bull. 58, 1].

2.2 Das taxonomische System der Pilze

Die Spezies der Familie der *Arthrodermataceae* gehören zur Ordnung *Onygenales* und somit zur Abteilung der *Ascomycota*.

Abbildung 1. Systematische Gliederung, der in dieser Arbeit erwähnten Pilzgruppen.

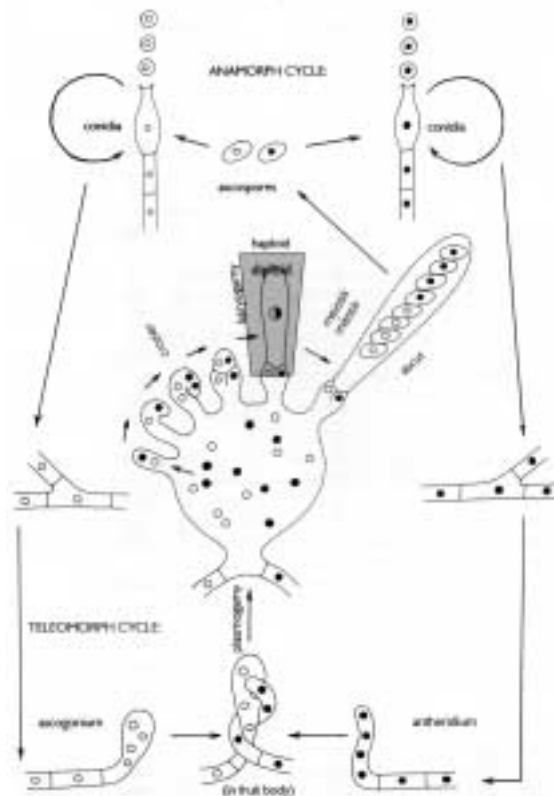


Ascomyzeten werden aufgrund ihrer sexuellen Vermehrungsform (=Teleomorph) klassifiziert. Die teleomorphe Gattung innerhalb der Familie der *Arthrodermataceae* ist die Gattung *Arthroderma*. Von den meisten Dermatophytenarten wird jedoch nur die asexuelle Vermehrungsform (Anamorph) ausgebildet. Auf Grund dessen werden Dermatophyten in die 3 anamorphen Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton* unterteilt [Currah, R.S., 1985, Mycotaxon 24, 1-216, Weitzman, I. et al., 1986, Mycotaxon 25, 505-518]. Diese Systematik der Pilze ist Laien oftmals schwer verständlich, da die getrennte Bezeichnung und Zuordnung asexueller und sexueller Vermehrungsformen (Ana- und Teleomorph) ein und derselben Spezies verwirrend ist (Tab. 1, Abb. 2). Sie erfolgte jedoch zu einer Zeit, als die Verbindung zwischen den beiden Sporulationsformen noch nicht bekannt war. Den vollständigen Lebenszyklus der Pilze nennt man das "Holomorph" (Anamorph + Teleomorph = Holomorph). Pilze können sich sexuell vermehren, indem sie mit sich selbst meiotisch rekombinieren ("selfing"); in diesem Falle sind sie homothallisch. Wenn jedoch für die Ausbildung meiotischer Fruchtkörper, wie bei den Spezies der Gattung *Arthroderma*, zwei

verschiedene Stämme (als „+“ oder „-“, Stamm bezeichnet) verschmelzen müssen, dann nennt man diese heterothallisch. Der entstandene Fruchtkörper (Ascocarp) wird bei den *Onygenales* auch als Gymnothezium bezeichnet. Er besteht bei den *Arthrodermataceae* aus lose, ineinander gewobenen, dünnwandigen, leicht kolorierten Hyphen. Die Produktion der typischen 8 Meiosporen (Ascosporen) erfolgt in seinem Innern [Abb. 2, Currah, R.S., 1985, Mycotaxon 24, 1-216].

Abbildung 2.

Schematische Darstellung des holomorphen Lebenszyklus der Ascomyceten. Die untere Hälfte zeigt den sexuellen (teleomorphen) Zyklus, die obere den asexuellen (anamorphen) Zyklus. Der diploide Teil des Lebenszyklus ist grau unterlegt.



2.3 Die klassische Taxonomie der Familie der *Arthrodermataceae*

Für die Einordnung in die Gattung *Arthroderma* wird seit den 60er Jahren das biologische Spezieskonzept verwendet, d.h. Stämme werden zur gleichen Art gerechnet, wenn sie erfolgreich miteinander kreuzen und die typischen Fruchtkörper ausbilden können (meiotische Rekombination). Die folgende Generation muß dabei lebensfähig sein. Tabelle 1 zeigt Beispiele von Ana- und Teleomorphverbindungen innerhalb der Familie *Arthrodermataceae*. In der Praxis ist dieses Konzept der Identifizierung über teleomorphe Merkmale aber schlecht anzuwenden, da sexuelle Vermehrung nur unter bestimmten Umweltbedingungen stattfindet und auf warmblütigen Tieren, einschließlich des Menschen nie vorkommt. Selbst wenn Dermatophytenarten potentiell in der Lage sind, Gymnothezien auszubilden, sind die Ergebnisse von "in vitro"-Kreuzungsexperimenten ("mating"-Experimenten) oft

unbefriedigend, da die natürlichen Bedingungen recht unterschiedlich sein können. Hinzu kommt, daß einer der beiden Kreuzungspartner ("mating"-Partner) in seiner ökologischen Nische viel häufiger vorkommen kann. Das trifft vor allem für die tier- und menschassoziierten Dermatophytenarten zu, einer der Gründe, warum es unter ihnen viele anamorphe Arten

Tabelle 1. Ausgewählte Dermatophytenspezies und ihre Teleomorphe, Verbreitung und ökologischen Nischen entsprechend der neuen Nomenklatur. Die mit (N.) bezeichneten Teleomorphspezies wurden früher als Gattung „*Nannizzia*“ bezeichnet und erst vor kurzem mit „*Arthroderma*“ vereinigt.

Anamorph	Teleomorph	ökol. Nische/ Wirtsspezies	Verbreitung
<i>E. floccosum</i>	nicht bekannt	anthropophil Mensch	weltweit
<i>M. audouinii</i>	nicht bekannt		weltweit
<i>M. ferrugineum</i>	nicht bekannt		Afrika, Asien
<i>T. concentricum</i>	nicht bekannt		Asien
<i>T. interdigitale</i>	<i>A. vanbreuseghemii</i>		weltweit
<i>T. rubrum</i>	nicht bekannt		weltweit
<i>T. schoenleinii</i>	nicht bekannt		Afrika, Asien
<i>T. tonsurans</i>	nicht bekannt		weltweit
<i>T. violaceum</i>	nicht bekannt		Afrika
<i>M. canis</i>	<i>A. (N.) otae</i>		zoophil Katze, Hund
<i>M. nanum</i>	<i>A. (N.) obtusum</i>	Schwein	
<i>T. erinacei</i>	<i>A. benhamiae</i>	Igel	
<i>T. mentagrophytes</i>		Nagetiere	
<i>T. simii</i>	<i>A. simii</i>	Affe	
<i>T. verrucosum</i>	nicht bekannt	Rind	
<i>M. amazonicum</i>	<i>A. (N.) borellii</i>	geophil Erdboden	Brasilien
<i>M. cookei</i>	<i>A. (N.) cajetani</i>		weltweit
<i>M. fulvum</i>	<i>A. (N.) fulvum</i>		weltweit
<i>M. gallinae</i>	<i>A. (N.) grubyi</i>		weltweit
<i>M. gypseum</i>	<i>A. (N.) gypseum</i>		weltweit
<i>M. gypseum</i>	<i>A. (N.) incurvatum</i>		weltweit
<i>M. persicolor</i>	<i>A. (N.) persicolor</i>		weltweit
<i>T. ajelloi</i>	<i>A. uncinatum</i>		weltweit
<i>T. avaricum</i>	<i>A. avaricum</i>		USA
<i>T. flavescens</i>	<i>A. flavescens</i>		Australien
<i>T. georgiae</i>	<i>A. ciferrii</i>		USA, Europa, Australien
<i>T. gloriae</i>	<i>A. gloriae</i>		USA
<i>T. phaseoliforme</i>	nicht bekannt		Europa, Amerika
<i>T. terrestre</i>	<i>A. insigulare</i>		weltweit
<i>T. terrestre</i>	<i>A. lenticulare</i>		weltweit
<i>T. terrestre</i>	<i>A. quadrifidum</i>		weltweit
<i>T. thuringiense</i>	nicht bekannt		Thüringen
<i>T. vanbreuseghemii</i>	<i>A. gertleri</i>		weltweit
nicht bekannt	<i>A. melis</i>		Böhmen

(z.B. *T. rubrum*, *M. audouinii*, *E. floccosum*, vgl. Tab. 1) gibt, bei denen bisher kein entsprechendes Teleomorph gefunden wurde.

Ganz allgemein sind bisher ca. 20 Konzepte für die Klassifizierung von Arten bekannt, die in der Regel auf deren phänotypischen Merkmalen/Eigenschaften beruhen. Keines davon ist bis jetzt in der Lage, die viel diskutierte Frage - Was wir unter einer Spezies zu verstehen haben -zufriedenstellend zu lösen bzw. zu definieren. Auch das unter Bakteriologen favorisierte molekulare Spezieskonzept, auf Grundlage von DNA-DNA-Homologien und 16S rDNA Sequenzen löst dieses Problem nicht zur Zufriedenheit aller Beteiligten (Mediziner vs. Biologen), bringt jedoch einen anderen Aspekt, nämlich den des Genotyps, der von der Expression und deren Beeinflussung durch Umweltbedingungen unabhängig ist, mit ein [Stackebrandt, E & Göbel, B.M., 1994, Int. J. Syst. Bact. 44, 846-849]. Für die Typisierung von Pilzspezies ist die Variabilität der kleinen Untereinheit des ribosomalen Operons in der Regel nicht ausreichend. Besser eignen sich dafür polymorphe Regionen dieses Operons wie zum Beispiel die „internal transcribed spacer“ (ITS) Region oder eben andere Gene (Tubulin, Elongationsfaktoren usw.). In Bezug auf die Dermatophyten sind jedoch auf ITS-Ebene morphologisch definierte Spezies nicht immer zu unterscheiden. Selbst auf Stammniveau sind bei den Dermatophyten, im Vergleich zu anderen Pilzspezies wie beispielsweise *Candida albicans*, hoch auflösende Methoden (DNA-Fingerprinting, AFLP, RAPD usw.) nicht in der Lage, individuelle Genotypen zu erzeugen [3-6]. Das zeigt, daß die Inter- bzw. Intraspeziesvariabilität von verschiedenen Gruppen u.U. sehr breit gefächert sein kann. Um den Umfang dieser Variabilität auszuloten, müssen in die Neuevaluierung eines Spezieskonzeptes immer zusätzliche, molekulare Marker miteinbezogen werden [7]. Das können kodierende Gene und/oder nichtkodierende DNA-Bereiche (Introne oder Mikrosatelliten) sein. Sie müssen vor allem die entsprechende Evolutionsrate aufweisen, um die jeweilige Organismengruppe charakterisieren zu können.

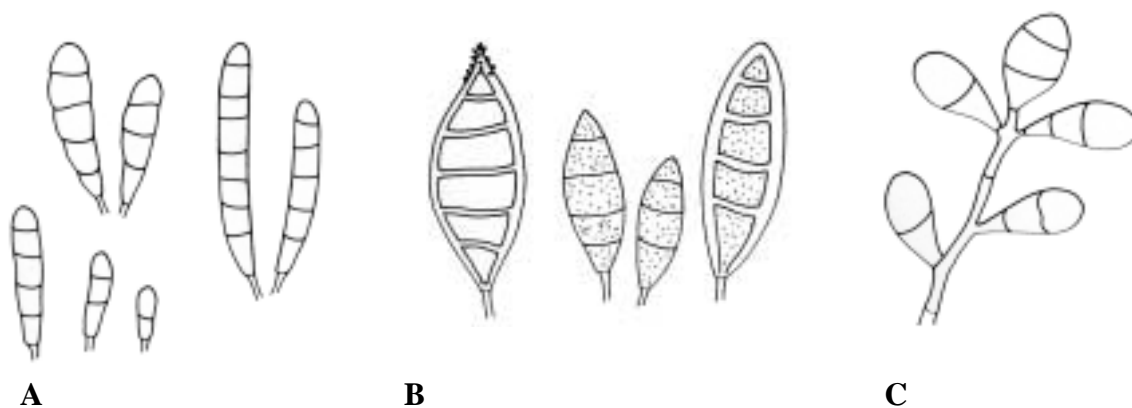
Die Basis einer allgemeingültigen Nomenklatur muß letztendlich auch aus mehr als einem einzigen Datenset („polyphasic approach“) bestehen – sie sollte eine sinnvolle Komposition nicht nur molekularer, sondern auch morphologischer, physiologischer, ökologischer und pathogener Merkmale zur Unterscheidung von Organismen sein.

2.3.1 Morphologie und Physiologie

Die tier- und humanpathogenen Dermatophytenspezies sind hauptsächlich Vertreter der anamorphen Gattungen *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton*, die man früher unter dem Begriff "Fungi imperfecti" zusammengefaßt hat, wenn sie sich ausschließlich vegetativ vermehren. Morphologisch sind *Trichophyton*-Spezies durch glattwandige, vielzellige Makrokonidien gekennzeichnet, wohingegen Arten, die zur Gattung *Microsporum* gehören, rauhe und zumeist spindelförmige, dickwandige Makrokonidien besitzen. Beide

Gattungen produzieren einzellige Mikrokonidien. Die Gattung *Epidermophyton*, die auf die Spezies *E. floccosum* reduziert werden kann [2], zeigt dagegen nur Makrokonidien, keine Mikrokonidien [Abb. 3, Currah, R.S., 1985, Mycotaxon 24, 1-216].

Abbildung 3. Differenzierung der Makrokonidien der anamorphen Gattungen der Dermatophyten. (A) *Trichophyton*, (B) *Microsporum* und (C) *Epidermophyton*.



Dermatophyten neigen zur Pleomorphie, d.h. viele phänotypische Merkmale werden nach Passagierung nicht mehr exprimiert; farbige Metabolite, die für Primärkulturen charakteristisch sind, gehen verloren; flaumige sterile Sektoren entstehen innerhalb einer solchen Pilzkolonie, ein Zeichen dafür, daß keine Sporulation mehr stattfindet. Aus diesem Grunde wurden schon frühzeitig andere Merkmale wie der Standort (Wirtsspezies), von dem der Pilz isoliert wurde, das Krankheitsbild, welches durch ihn verursacht wurde sowie die geographische Herkunft mit zur Klassifizierung herangezogen. Dadurch kann z. B. ein schlecht oder nicht sporulierendes *M. canis* Isolat, wenn es von einer Katze (ökologische Nische für *M. canis*) stammt auch als solches erkannt werden. Wenn der gleiche Stamm jedoch zu einer Tinea capitis-Infektion beim Menschen führt und von diesem isoliert wird und dieser Mensch aus Afrika oder Amerika stammt, wird er als *M. audouinii*, wenn der Patient aus Asien stammt auch als *M. ferrugineum* diagnostiziert werden. Dieses Beispiel zeigt das ganze Dilemma der derzeitigen Systematik.

Die vielen Ausnahmen und Varianten [Kane, J. et al., 1997, Star Publ., Belmont, USA], welche oft genug als separate Mikrotaxa, bis hin zum Niveau von *Form* oder *Subvarietät* [Ajello, L., 1977, Ed. Iwata, K., Univ. Tokyo, p. 3-11] eingeführt wurden, verkomplizieren die klassische Taxonomie der Dermatophyten in entschiedenem Maße. Nur wenige Experten sind daher in der Lage, seltene oder eng verwandte Spezies präzise zu bestimmen. DNA basierte Daten bestätigen zwar oft die nahe Verwandtschaft wie die der im obigen Beispiel erwähnten 3 Spezies, sind aber in der Lage, eindeutig zwischen ihnen zu

diskriminieren [8]. Ein Umstand, der sowohl für epidemiologische Studien (Erregerwandel) als auch therapeutische Maßnahmen (speziesspezifische Resistenz gegenüber Antimykotika) unerlässlich ist.

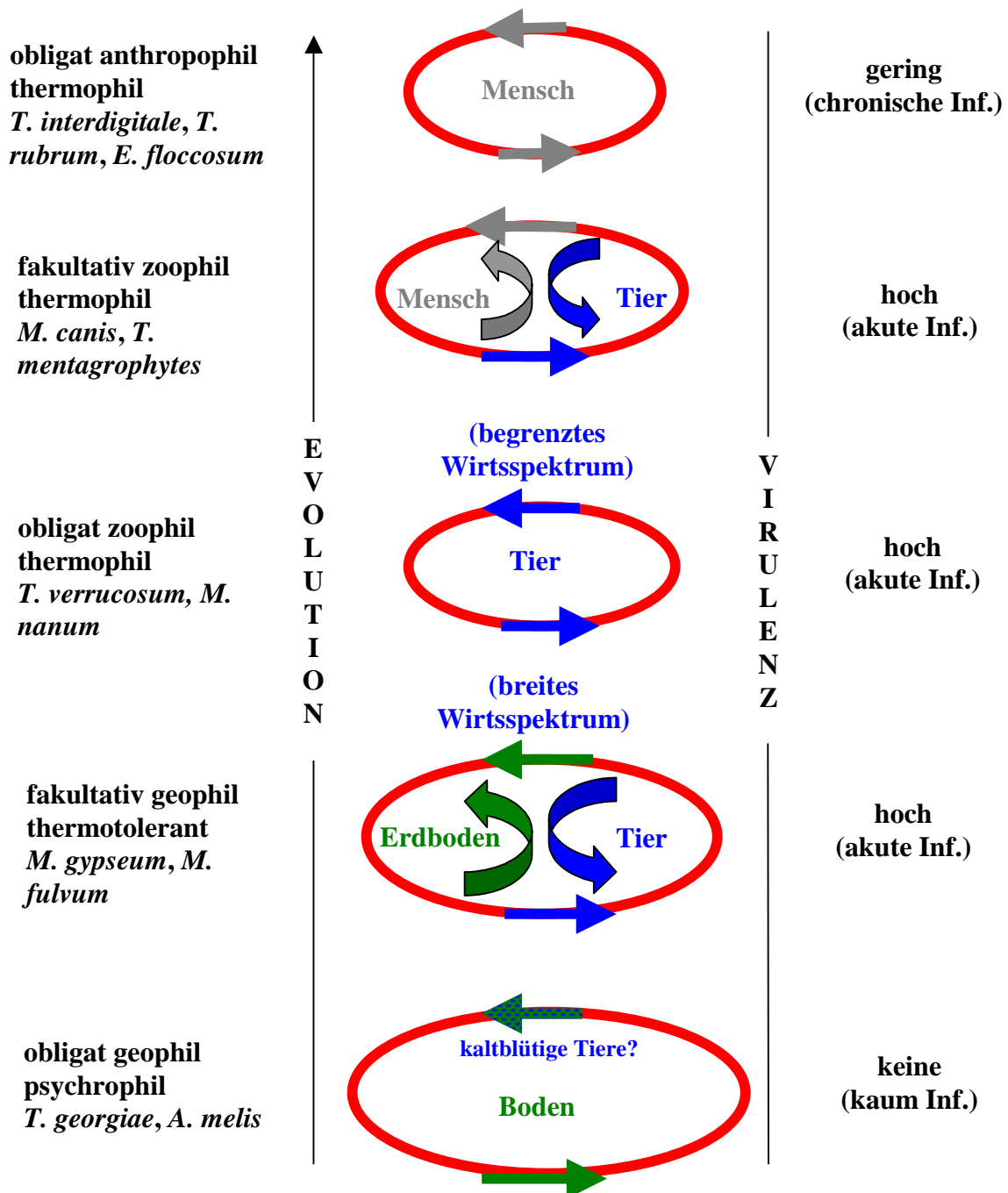
Da man schon vor Jahrzehnten erkannte, daß der „Morphotyp“ von Dermatophyten instabil sein kann [Sabouraud, R., 1910, Masson, Paris 855 pp.] und nur in Primärkulturen relativ gut ausgebildet wird, führten Georg [Georg, L.K., 1957, 11th Congr. Dermatol., Stockholm] und Shadomy & Philpot [Shadomy, H.J. & Philpot, C.M., 1980, Am. J. Clin. Pathol. 74, 197-201] die nutritive Physiologie als diagnostische Differenzierungsmethode für die Dermatophyten ein, nicht um neue Spezies zu beschreiben, sondern um die bereits existierenden qualifizierter bestimmen zu können. Dabei werden Eigenschaften der Dermatophyten wie Ureaseaktivität oder das Vermögen Haare zu perforieren, sowie bestimmte Aminosäuren und Vitamine zu assimilieren zur Typisierung herangezogen. Dieses Identifizierungssystem wurde durch kanadische Taxonomen [Kane, J. et al., 1997, Star Publ., Belmont, USA] weiter ausgearbeitet. In der Praxis reichen aber auch physiologische Daten kaum aus, um subkultivierte Isolate oder Kollektionsstämme zu bestimmen, da das System nicht ausreichend differenziert. Auch das folgende Beispiel zeigt die Insuffizienz des anamophen Spezieskonzeptes. So gehören zu den anamorphen Arten *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* und *T. terrestre* jeweils 2-3 teleomorphe, biologische Spezies, da sie weder auf Grund morphologischer noch physiologischer Merkmale voneinander getrennt werden können (s. Tab. 1). Mating-Experimente zur Differenzierung sind allerdings nicht nur für die medizinische Diagnostik, auf Grund der weiter oben diskutierten Nachteile als unzumutbar anzusehn. Untersuchungen auf Basis molekularbiologischer Daten können dieses Problem lösen und zeigen, daß jeder teleomorphen Spezies ein anamorpher Genotyp zugeordnet werden kann, der sich vor allem ökologisch/pathogenetisch definiert. Der sich aber auch morphologisch definieren läßt, wenn man genotypisch differenzierte Stämme in der Hand hat [2, 7].

2.3.2 Natürliche Ökologie, Epidemiologie und Krankheitsbilder

Ökologisch unterteilt man Dermatophyten in 3 Gruppen: anthropophil, zoophil und geophil (Tab. 1). Die anthropophilen Erreger wie *T. rubrum*, *T. interdigitale* oder *E. floccosum* werden ausschließlich von Mensch-zu-Mensch übertragen (Abb. 4). In der Umwelt können sie zwar durch die Ausbildung von Arthrokonidien (Dauerformen) für einen längeren Zeitraum (bis zu 2 Jahre) überleben, sich aber nicht vermehren. Auf Tieren werden anthropophile Arten nur Ausnahmsweise gefunden, infektiös sind sie dort nicht. Somit bildet der Mensch die einzige, bekannte ökologische Nische für diese Spezies. Wenn man annimmt, daß sie sich über die Zeit an den Menschen adaptiert haben, ist das vermutlich der Hauptgrund, warum sie dort in der Regel nur milde, chronische Infektionen auslösen (ca. 70% aller Dermatophytosen) [Weitzman, I. & Summerbell, R.C., 1995, Clin. Microbiol. Rev. 8, 240-259].

Die ökologische Nische zoophiler Erreger (*M. canis*, *T. verrucosum* oder *T. mentagrophytes*) ist das warmblütige Tier. Einige Spezies haben ein sehr begrenztes Wirtsspektrum wie *T. verrucosum*, die fast ausschließlich von Rindern isoliert wird oder *M. canis*, die man bevorzugt bei Katzen findet (Abb. 4). Hier können diese Erreger Dermatophyten

Abbildung 4. Schematische Darstellung der Evolution und Virulenzgrad der Dermatophyten in Bezug zum menschlichen Wirt. Die Größe der Ellipsen stellt ein Maß für die Anzahl der Spezies dar.



verursachen, wenn die Umweltbedingungen und der Immunstatus des Wirtes es zu lassen (Wetter, Stallhaltung, Massentierhaltung). Normalerweise ist der entsprechende Wirt aber nur asymptomatischer Träger [Sparkers, A.H. et al., 1994, J. Small. Anim. Pract. 35, 397-401]. Viele zoophile Dermatophyten besitzen aber, im Gegensatz zu den anthrophophilen, das Potential auf andere Wirtsspezies z.B. den Menschen übertragen zu werden und dort kutane Infektionen zu verursachen (ca. 30%). Als häufigste Infektionsquelle gelten dabei Haustiere wie Katzen, Hunde, Meerschweine und Pferde mit denen die Menschen engen Kontakt haben.

Die geophilen Arten sind Bodenbewohner, die auf totem, keratinhaltigen Substrat leben. Ihre Verbreitung ist demzufolge stark von der Verfügbarkeit solcher Substrate abhängig, wird aber auch durch den pH-Wert des Bodens beeinflusst. Die fakultativ geophilen Arten wie *M. gypseum* oder *M. fulvum* infizieren Tiere oder Menschen nur äußerst selten (ca. 3%) [Weitzman, I. & Summerbell, R.C., 1995, Clin. Microbiol. Rev. 8, 240-259], die obligat geophilen dagegen fast nie.

Die beiden zuletzt erwähnten ökologischen Gruppen verursachen beim Menschen bei intaktem Immunsystem akut inflammatorische Dermatophytosen, da sie nicht adaptiert sind und der Mensch demzufolge einen Fehlwirt darstellt (Abb. 4). Die durch sie ausgelöste, zellvermittelte Immunreaktion resultiert in einer Th1-Antwort und ist mit einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV, DTH) gegen Trichophytin gekoppelt. Im allgemeinen führt dies zu einer inflammatorischen Infektion, die innerhalb kurzer Zeit spontan abheilen kann [Wagner, D.K. & Sohnle, P.G., 1995, Clin. Microbiol. Rev. 8, 318-335]. Man könnte sich vorstellen, daß durch eine relativ schnelle Eliminierung des Erregers durch die Immunabwehr des menschlichen Wirtes, die Transmissionsrate für diese Erreger sinkt. Die chronischen Erkrankungen, die durch anthropophile Spezies ausgelöst werden (Abb. 4), sind dagegen das Ergebnis einer Th2-Antwort, die durch IgE spezifische Antikörper vermittelt wird und an eine Überempfindlichkeit vom Soforttyp (Typ I, IH) gekoppelt ist [Leibovici, V. et al., 1995, Clin. Exp. Dermatol. 20, 390-394]. Dabei persistiert der Erreger über einen langen Zeitraum im Wirt und könnte so seine Transmissionsrate erhöhen. Von welchen Faktoren im einzelnen die Ausprägung des Antworttypes abhängt, ist noch nicht geklärt. Sowohl die Ausstattung des Erregers, wie Zusammensetzung der Zellwandantigene (Mannan!), u.U. aber auch prädisponierende Faktoren des Wirtes [Dahl, M.V. & Grando, S.A., 1994, Adv. Dermatol. 9, 97-111] können dafür eine Rolle zu spielen.

2.4 Problemstellung

Die Studien zur molekularen Biodiversität innerhalb der Dermatophyten sollen zur Klärung evolutionärer, taxonomischer und populationsgenetischer Zusammenhänge bei den verschiedenen Spezies der Gattung *Arthroderma* beitragen und helfen, geeignete DNA-Marker für die Anwendung in der medizinischen Diagnostik zu finden und einzusetzen.

3. Methodik

3.1 Anwendung molekularer Methoden zur Evaluierung der Taxonomie und Phylogenie der Dermatophyten

Nicht nur auf Grund der unbefriedigenden diagnostischen, sondern auch taxonomischen Situation gehörten die Dermatophyten mit zu den ersten Pilzgruppen, bei denen molekulare Methoden zur Evaluierung der Systematik herangezogen wurden. Neben den Studien zur genomischen DNA-Homologie erzielten jedoch auch die Untersuchungen zum G+C-Gehalt der Dermatophyten keine zufriedenstellenden Ergebnisse [Davison, F.D. et al., 1980, J. Gen. Microbiol. 118, 465-470, Davison, F.D. & Mackenzie, D.W.R., 1984, J. Med. Vet. Mycol. 22, 117-123]. Beide Methoden waren nicht in der Lage, mögliche Speziesgrenzen aufzuzeigen. Das heißt die untersuchten Spezies der 3 Gattungen *Epidermophyton*, *Microsporum* und *Trichophyton* zeigten z.B. kaum Unterschiede in Bezug auf ihren G+C-Gehalt (48.7-50.3%). Im Vergleich dazu variiert dieser Wert unter den Spezies der Gattung *Aspergillus* bspw. zwischen 48-61% [Storck, R. & Alexopoulos, C.J., 1970, Sabouraudia 5, 355-359]. Versuche, die humanassoziierten Spezies mit Hilfe von Restriktionsfragmentanalysen (RFLP) der mitochondrialen DNA [Nishio, K. et al., 1992, Mycopathologia, 117, 127-132] oder durch Sequenzierung, der bei Bakterien auf Speziesebene gut differenzierenden kleinen ribosomalen Untereinheit [18S rDNA, Harmsen, D. et al., 1995, J. Med. Vet. Mycol. 33, 299-303] zu typisieren, schlugen fehl. Die Studie zur Sequenzierung der großen ribosomalen Untereinheit zeigte, daß die 2 verwendeten geophilen Dermatophyten, *T. ajelloi* und *T. terrestre* die größte Distanz zu den restlichen Spezies aufweisen [28S rDNA, Leclerc, M. C. et al., 1994, J. Med. Vet. Mycol. 32, 331-341]. Der Nachteil dieser Studien war, daß die untersuchten DNA-Regionen innerhalb der mtDNA und rDNA (18S und 28S) zu konserviert waren, d.h. eine zu geringe Anzahl an Polymorphismen aufwiesen, um alle humanassoziierten Arten differenzieren zu können (*M. canis* und *M. audouinii*, *T. mentagrphytes* und *T. schoenleinii*). Erst die Sequenzierung schneller evolvierender Genabschnitte der rDNA, wie die ITS aber auch das PCR-Fingerprinting und vor allem auch die Einbeziehung nahezu aller gültigen bzw. bis dato noch verfügbaren, schon synonymisierten Dermatophytenarten (von geophilen, über zoophilen bis hin zu den anthropophilen) ermöglichte phylogenetische und taxonomische Schlußfolgerungen sowie Rückschlüsse auf die Evolution der Dermatophyten hinsichtlich ihrer ökologischen Strategie zu ziehen [9].

RAPD Analysen [Mochizuki, T. et al., 1997, Mycoses 40, 405-409], AP-(„arbitrary primed“) PCR [Liu, D. et al., 1996, FEMS Microbiol. Lett. 136, 147-150] und die Sequenzierung anderer Gene, wie der Chitinsynthase [Kano, R. et al, 1997, Mycoses 40, 411-414] konnten diese Resultate bestätigen. Bisher ist aber noch keine überzeugende Methode bzw. Genomregion gefunden worden, die in der Lage ist, innerhalb der Art bzw. zwischen einigen

morphologisch definierten Arten zu diskriminieren. Das führte zu der Überzeugung, daß viele Mikrotaxa, die mit konventioneller Methodik differenziert werden können, überklassifiziert und eigentlich identisch sind. Eine revidierte Taxonomie der Dermatophyten wurde deshalb von uns vorgeschlagen [7-8, 10-11, Tab. 2].

Tabelle 2. Die neue Taxonomie der Familie der *Arthrodermataceae* auf Grundlage morphologischer, ökologischer und genetischer Daten.

Neue Taxonomie Ana/Teleomorph [Referenz]	Alte Taxonomie (synonymisierte Taxa)	Neue Taxonomie Ana/Teleomorph [Referenz]	Alte taxonomie (synonymisierte Taxa)
<i>T. tonsurans</i> [7, 19]	<i>T. areolatum</i> <i>T. floriforme</i> <i>T. spadiceum</i> <i>T. tonsurans</i> var. <i>crateriforme</i> <i>T. tonsurans</i> var. <i>epilans</i> <i>T. tonsurans</i> var. <i>sulfureum</i>	<i>T. violaceum</i> [10]	<i>T. glabrum</i> <i>T. gourvilii</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. violaceum</i> var. <i>indicum</i> <i>T. violaceum</i> var. <i>violaceum</i>
<i>T. equinum</i>	<i>T. equinum</i> var. <i>autotrophicum</i> <i>T. equinum</i> var. <i>equinum</i>		<i>T. yaoundei</i> <i>M. langeronii</i> <i>M. rivalieri</i> <i>M. distortum</i> <i>M. equinum</i>
<i>T. balcanicum</i> [7, 10]	<i>T. abissinicum</i> <i>T. balcanicum</i> <i>T. immergens</i> <i>T. radicosum</i>	<i>M. audouinii</i> [8] <i>M. canis/A. otae</i> [8]	identisch identisch identisch identisch identisch
<i>T. interdigitale/A. vanreuseghemii</i> [7]	<i>T. batonroughei</i> <i>T. candelabreum</i> <i>T. krajdenui</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>nodulare</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i> <i>T. rotundum</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>autotrophicum</i>	<i>M. ferrugineum</i> [8] <i>E. floccosum</i> [7] <i>M. nanum/A. obtusum</i> [9] <i>M. praecox</i> [9] <i>M. persicolor/A. persicolor</i> [9] <i>M. gypseum/A. gypseum</i> [2, 9] <i>M. duboisii</i> [9] <i>M. sp./A. corniculatum</i> [9] <i>M. fulvum/A. fulvum</i> [2, 9]	identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch <i>K. longifusus</i> <i>M. boullardii</i> <i>M. ripariae</i>
<i>T. mentagrophytes</i> [7]	<i>T. depressum</i> <i>T. langeronii</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeianum</i> <i>T. papillosum</i> <i>T. sarkisovii</i>	<i>M. gypseum/A. incurvatum</i> [9] <i>M. cookei/A. cajetani</i> [9] <i>M. racemosa/A. racemosum</i> [9] <i>A. cookiella</i> [9] <i>M. gallinae/A. grubyi</i> [2, 9] <i>M. amazonicum/A. borelli</i> [9] <i>T. gloriae/A. gloriae</i> [9] <i>T. vanbreuseghemii/A. Gertleri</i> [2, 9] <i>T. ajelloi/A. uncinatum</i> [2, 9]	identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch <i>T. ajelloi</i> var. <i>nanum</i> <i>E. stockdaleae</i>
<i>T. simii/A. simii</i> [7] <i>T. schoenleinii</i> [7] <i>T. erinacei/A. benhamiae</i> [7] <i>T. verrucosum</i> [7, 11, 16]	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> <i>T. proliferans</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>album</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>discoides</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>ochraceum</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>	<i>T. terrestre/A. lenticulare</i> [9] <i>T. terrestre/A. quadrifidum</i> [9] <i>T. terrestre/A. insingulare</i> [2, 9] <i>T. flavescens/A. flavescens</i> [9] <i>A. melis</i> [9] <i>T. georgiae/A. ciferrii</i> [9] <i>C. sp./A. multifidum</i> [9] <i>C. sp./A. tuberculatum</i> [9] <i>C. sp./A. cuniculi</i> [2, 9] <i>T. thuringiense</i> [9] <i>T. phaseoliforme</i> [9] <i>C. sp./Ctenomyces serratus</i> [9] <i>K. ceretanicus</i> [9] <i>C. sp./A. curreyi</i> [2, 9]	identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch identisch
<i>T. concentricum</i> [7] <i>T. eriotrephon</i> [7] <i>T. rubrum</i> [10]	identisch <i>T. circonvolutum</i> <i>T. fischeri</i> <i>T. fluviomuniense</i> <i>T. kanei</i> <i>T. kuryangei</i> <i>T. megninii</i> <i>T. pedis</i> <i>T. pervesii</i> <i>T. raubitscheckii</i> <i>T. rodhainii</i>		

3.2 Das ribosomale Operon, einschließlich der ITS als phylogenetischer Marker

Die eukaryontischen nukleären ribosomalen Gene sind in Clustern organisiert, die aus den Genen (Abb. 5, rot) für die kleine Untereinheit (16S bis 18S; wobei S für Svedburg-Einheiten steht und ein Maß für die Sedimentationsrate darstellt), die große Untereinheit (26S bis 28S) und die 5.8S zusammengesetzt sind. Zwei „internal transcribed spacer“ (ITS) Regionen, die eine Funktion bei der Faltung der beiden ribosomalen Untereinheiten haben, separieren diese und werden während der Transkription herausgespleißt. Am 5' Ende der transkribierten RNA befindet sich die „external transcribed spacer“ (ETS) Region. Diese sechs Komponenten bilden das Basiscluster, welches tandemartig wiederholt in vielen Kopien im eukaryontischen Genom vorliegt. Zwischen jedem Cluster des tandemartig wiederholten Abschnitts liegt ein „nontranscribed spacer“ (NTS), der dazu dient die individuellen Cluster zu separieren. Generell sind die drei Gene konservierter als die transkribierten Spacer (Abb. 5, blau), welche wiederum konservierter sind als die nichttranskribierte Region (Abb. 5, grün). Aber auch innerhalb der konservierten Gene gibt es variablere Domänen (z.B. D1 und D2 der 26S-28S). Das ganze Basiscluster ist letztendlich ein Mosaik aus den unterschiedlichsten Evolutionsraten.

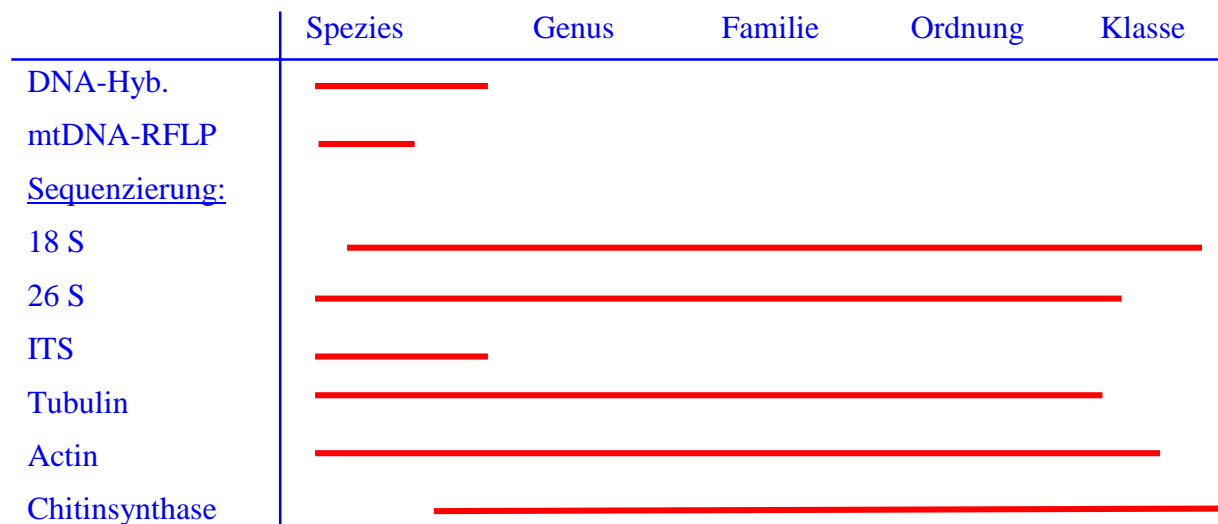
Abbildung 5. Das ribosomale Operon.



Diese Tatsache steigerte in den letzten Jahren die Attraktivität des ribosomalen Operons für die Lösung phylogenetischer Fragestellungen. Das hängt u.a. damit zusammen, daß Organismengruppen, auch solche innerhalb eines Reiches (wie die Pilze) nicht gleich schnell evolvieren. So hat man die Möglichkeit, je nachdem wie weit die zu untersuchenden Organismen verwandt sind bzw. welches Niveau an phylogenetischen Zusammenhängen (Art, Gattung, Familie usw.) man darstellen möchte, die geeignete Region auswählen (Abb. 6). Damit im Zusammenhang steht, daß das gesamte ribosomale Cluster einer "concerted evolution" unterliegt, d.h. seine Kopien werden innerhalb des Genoms homogenisiert; damit evolviert diese Multigenfamilie wie ein Einzelgen und paraloge Kopien stellen somit kein echtes Problem für die Analyse dar [Hillis, D.M. et al., 1991, Science 251, 308-310]. Weitere Vorteile der ribosomalen DNA sind ihr universelles Vorkommen in allen Organismen, so daß man selbst Individuen verschiedener Reiche (Pflanzen, Pilze, Bakterien) miteinander vergleichen kann. Das Vorhandensein einer hohen Kopienzahl pro Zelle spielt im Zuge der PCR nicht mehr die entscheidende Rolle, bildete aber in der Vergangenheit als RNA noch direkt

sequenziert wurde, einen entscheidenden Vorteil [Field K.G. et al., 1988, Science 239, 748-753].

Abbildung 6. Auflösungsbereiche ausgewählter Methoden und Genregionen in der Pilzsystematik.



Die transkribierten Spacer wie die ITS-Region gelten nicht als phylogenetische Marker der Wahl, da auf ihnen nur ein begrenzter Selektionsdruck liegt und sie auf Grund dessen häufiger mutiert werden. Sie neigen zu Insertionen/Deletionen. Substitutionen sind dabei seltener. Durch die entstehenden Längenpolymorphismen wird das Alignment zwischen zu vergleichenden Stämmen erschwert und nicht alle Nukleotide können somit für die Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft genutzt werden. Müssen jedoch eng verwandte Organismengruppen, wie die Dermatophyten miteinander verglichen werden, ist auch diese Region von potentiell Nutzen, sofern sie variabel genug ist und möglichst morphologisch/ökologische Zusammenhänge widerspiegelt. Phylogenetische Schlußfolgerung auf höherem Niveau, oft schon innerhalb der Gattung, aber in jedem Fall ab Gattungsebene aufwärts sind bei den Pilzen an Hand dieser Region nicht möglich, da auf Grund von zu viel Homoplasie (Rück-, Parallelmutationen...) keine konsistenten Ergebnisse erzielt werden können (Abb. 6).

Um die Variationsbreite der ITS bei den Pilzen zu demonstrieren an dieser Stelle drei Beispiele. Einige Arten der Gattung *Trichoderma* (Abb. 1, Ordnung: *Hypocreales*) sind so nah miteinander verwandt, daß man keine Polymorphismen innerhalb der ITS gefunden hat, obwohl sie morphologisch gut voneinander zu differenzieren sind [Lieckfeldt, E. & Seifert, K.A., 2000, Stud. Mycol. 45, 35-44]. Hier waren die Untersuchungen des β -Tubulins besser geeignet, um phylogenetische Schlußfolgerungen zu ziehen. Bei den schwarzen Hefen der Gattung *Phialophora* (Abb. 1, Ordnung: *Chaetothyriales*) ist die Variabilitätsrate höher und

man war in der Lage, die morphologisch beschriebenen Taxa gut voneinander zu diskriminieren [De Hoog, G.S. et al., 1999, Stud. Mycol. 43, 107-122]. Es treten aber auch Fälle auf, wo bei nahezu identischem „Morphotyp“ die Variabilitätsraten innerhalb dieser Region so groß sind (Homoplasie!), daß das Alignment von zwei Sequenzen nahezu unmöglich wird [Abb. 1, Gattung *Geotrichum*, Ordnung: *Saccharomycetales*; De Hoog, pers. Mitt.]. Das verdeutlicht, daß bedingt durch die unterschiedlichen Variabilitätsraten innerhalb der ITS, diese nicht prinzipiell für die Klärung der Evolution/Phylogenie von Organismengruppen verwendet werden kann.

Bei den Pilzen kann man vermuten, daß sich die ITS-Region besonders dann für eine phylogenetische Analyse ausnutzen läßt, wenn die untersuchte Pilzgruppe relativ jung (entstehungsgeschichtlich) bzw. deren ökologische Nische eng begrenzt ist, wie z.B. bei den anthropophilen und zoophilen Dermatophyten [2, 7-8, 10], aber auch den schwarzen Hefen, deren ökologische Nischen die Anpassung an das Keratin der Haut, Haare, Nägel bzw. sehr salzige Umgebung wie bei *Hortea werneckii* (Ordnung: *Dothideales*) darstellen [Zalar, P. et al., 1999, Stud. Mycol. 43, 38-48]. Hier lassen sich auf Basis der ITS auch gute Speziesgrenzen festlegen.

Ausschließlich verlassen sollte man sich auf solche Daten jedoch nicht, denn auch die ITS-Daten zeigen letztendlich nur die Evolution eines einzigen Genortes auf und nicht notgedrungen auch die von Spezies (gene vs. species genealogy). Daraus ergibt sich ein weiterer Grund, der die Einbeziehung zusätzlicher, unabhängig voneinander evolvierender DNA-Regionen in phylogenetische Analysen nötig macht.

3.3 Weitere Marker, um Speziesgrenzen bei den Dermatophyten festzulegen

Neben morphologischen und physiologischen Markern wurden bei den Dermatophyten das PCR-Fingerprinting und die AFLP-Analyse angewendet, um die Ergebnisse, die aus dem Sequenzvergleich der ITS-Region gewonnen wurden, zu kalibrieren. Diese Methoden nutzen einzelne Zufallsprimer bzw. speziell entwickelte Primerpaare, um Subsets genomischer Restriktionsfragmente zu amplifizieren, die über spezielle Elektrophoresetechniken voneinander getrennt werden. Diese DNA-Regionen stellen nachweislich hypervariable Genombereiche bei allen Organismen dar und sind über alle Chromosomen verteilt [Meyer, W., 1992, Dissertation, HU-Berlin, 13-15]. So amplifiziert man mit dem sich einfach wiederholenden Primer wie (AC)₁₀, Genomregionen, die sich in der Nähe von Mikrosatellitenbereichen befinden. In der Humangenetik werden Mikrosatelliten genutzt, um z.B. Vaterschaftsanalysen durchzuführen [Krawczak, M. et al., 1993, For. Sci. Internat. 59, 101-107], sind also sehr polymorph. Da die anthropophilen, aber auch ein Teil zoophilen Dermatophytenspezies, einschließlich ihrer morphologisch definierten Varianten [8, 10-11, 16] keine Variabilität innerhalb der ITS zeigen, kann mit diesen Markern nachgewiesen

werden, ob sie sich tatsächlich exklusiv klonal vermehren oder ob es Rekombinationen/Variabilität innerhalb dieser hochpolymorphen Bereiche gibt.

Aber auch hier zeigen die Daten, daß im Vergleich zu *Candida albicans* [ein humaner Endosaprophyt, 17], bei welchem Stämme durch individuelle Muster charakterisiert sind, bei den an das warmblütige Säugetier adaptierten Dermatophytenarten keine DNA-Polymorphismen nachzuweisen sind. Evolutionsbiologisch läßt sich dieser Umstand bei den Dermatophyten damit erklären, daß sich diese Arten nicht nur strikt klonal vermehren, sondern auch vor nicht allzu langer Zeit, durch die Adaptation an eine ganz spezielle ökologische Nische (oder Bottleneck) wie sie z.B. das Mikroklima im Schuh eines Menschen darstellen könnte, entstanden sein müssen [18].

4. Ergebnisse und Diskussion

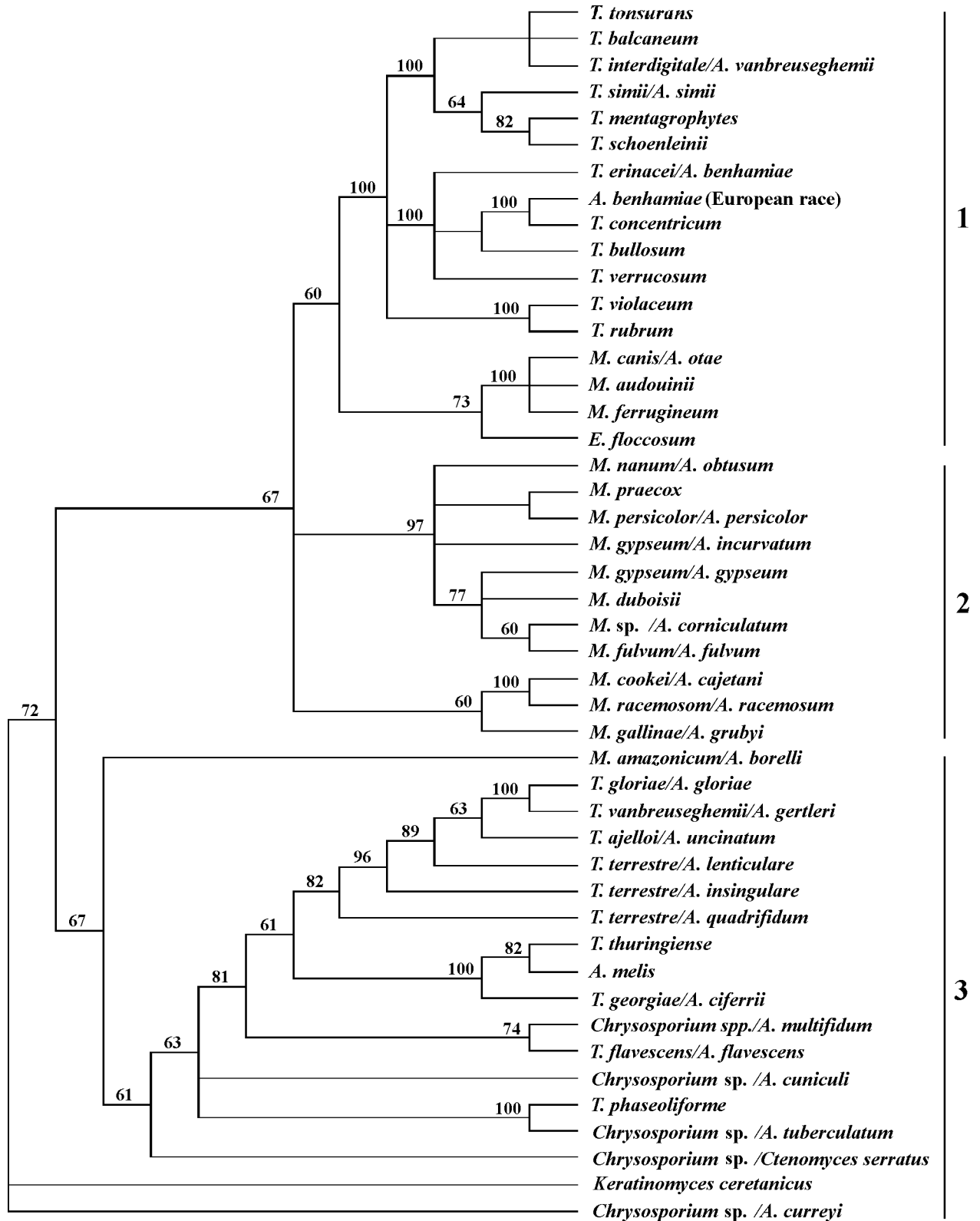
4.1 Die neue Systematik der Dermatophyten

4.1.1 Die anamorphen Gattungen *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton*

Im Gegensatz zur klassischen Taxonomie, die die Dermatophyten entsprechend ihrer phänotypischen Charakteristika in 3 monophyletischen Gattungen (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) unterteilt, stimmt die molekulare Phylogenie mit pathogenetischen und ökologischen Eigenschaften der Spezies überein [2, 9]. Diese zeigt jedoch, daß die 3 Taxa polyphyletisch sind. Auf Grund sexueller Reproduktion zeigen die strikt geophilen Spezies (*T. terrestre*, *T. ajelloi*, *T. gloriae*), die den polyphyletischen Zweig der Gattung *Trichophyton* bilden (Abb. 7, Gruppe 3), den höchsten Grad an morphologischer wie auch ITS-Sequenzdiversität. Die meisten von ihnen sind neben den Erstbeschreibungen (Typstämme) nur durch eine limitierte Anzahl von Isolaten repräsentiert. Jeder dieser anamorphen Arten konnte ein Teleomorph zugeordnet werden (vgl. Tab. 1). Diese Gruppe wird auch deutlich durch Sequenzdaten der 28S rDNA separiert [Leclerc, M. C. et al., 1994, J. Med. Vet. Mycol. 32, 331-341], die phylogenetisch gesehen etwas konsistenter sind als die ITS (Bootstrap Unterstützung!).

Microsporumspezies an sich (*M. nanum*, *M. gallinae*, Abb. 7, Gruppe 2) sind phylogenetisch kohärenter – die genetischen Distanzen untereinander sind geringer. Diese Spezies findet man im Fell von wilden oder domestizierten Säugetieren, andere Arten sind als Bodenbewohner bekannt. Vor allem letztere (*M. fulvum*, *M. gypseum*) führen bei Transmission auf die haarlose Haut von Tieren zu inflammatorischen kutanen Mykosen. Das zeigt, daß sie ein höheres pathogenetisches Potential besitzen als die obligat geophilen *Trichophytonspezies*, die phylogenetisch gesehen unter ihnen stehen. Ihre ökologische Nische kann als fakultativ geophil betrachtet werden.

Abbildung 7. Phylogenetischer Baum (consensus) der Familie der *Arthrodermataceae* basierend auf ITS1, 5.8 S und ITS2 Sequenzen. Die Bootstrap-Werte sind in % angegeben.



Der polyphyletische Zweig der Gattung *Trichophyton* (Abb. 7, Gruppe 1), der in erster Linie Spezies mit wenig differenzierten Konidien oder solche, die steril sind, enthält, ist paraphyletisch zu *Microsporum*. Die Gruppe 1 Spezies werden vor allem von Menschen isoliert, wo sie entweder akut inflammatorische, hauptsächlich jedoch milde, chronische Dermatophyosen verursachen. Einige von ihnen wie *T. interdigitale*, *T. concentricum*, *T. violaceum* und *T. rubrum* können als echte Anthropophile angesehen werden. Sie provozieren generell Infektionen mit einem geringen Entzündungsgrad. Sie können nur von Mensch-zu-Mensch übertragen werden. Obwohl in den letzten Jahren tausende solcher Isolate untersucht wurden, ist bei den meisten von ihnen immer noch keine teleomorphe Form gefunden worden (Tab. 1, 2). Somit scheint der Verlust des anderen, für die sexuelle Reproduktion benötigten Partners eine Tendenz in dieser Pilzgruppe darzustellen, die mit der Adaptation an einen Wirt einhergeht und zu ausschließlich klonaler Vermehrung führt. Diese Daten werden durch molekulare Studien zur Populationsstruktur von *T. rubrum* [PCR-Fingerprinting, AFLP- und SSCP-Marker, 18] bestätigt. Die obligat anthropophilen Spezies bilden jedoch kein monophyletisches Cluster innerhalb der Gruppe 1 (*T. interdigitale*, *T. rubrum*, *M. audouinii*, *E. floccosum*, Abb. 7). Das weist darauf hin, daß sich Anthropophilie innerhalb der Dermatophyten voneinander unabhängig entwickelt hat.

Die ökologische Relevanz in der Systematik der Dermatophyten spiegelt sich auch in der Synonymisierung von *E. stockdaleae* mit *T. ajelloi* wieder [2, Tab. 2]. Diese traditionell beschriebene, zweite, jedoch geophile *Epidermophyton*spezies ist morphologisch mit der anthropophilen Spezies *E. floccosum* verwandt. Molekulare Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß sie sich genetisch nicht von der an den Boden angepaßten Art *T. ajelloi* unterscheidet und phylogenetisch weit von *E. floccosum* entfernt ist, d.h. nicht in die Gattung *Epidermophyton* eingeordnet werden kann. Damit stellt sich auch die Frage, ob das Merkmal, keine Mikrokonidien, sondern nur Makrokonidien auszubilden, für die Klassifizierung in die Gattung *Epidermophyton* herangezogen werden sollte [2, Abb. 3].

Die Gruppe 1 enthält neben *Trichophyton* drei *Microsporum*arten und *E. floccosum*. Die ökologischen Strategien dieser Taxa stimmen jedoch gut überein. Das führt zu der Frage, ob die drei bestehenden anamorphen Gattungen nicht neu definiert werden sollten. Die beiden teleomorphen Gattungen *Arthroderma* (Teleomorph von *Trichophyton*arten) und *Nannizzia* (teleomorphen Gattung von *Microsporum*) wurden erst kürzlich auf Basis morphologischer Merkmale vereinigt [Weitzman, I. et al., 1986, Mycotaxon 25, 505-518]. Wenn ökologische Nischen in weitgehender Übereinstimmung mit phänotypischen Charakteristika eine natürliche Klassifizierung erlauben, sollte die Nomenklatur entsprechend angepaßt werden.

4.1.2 Die anthropophilen und zoophilen Dermatophytenspezies

4.1.2.1 Der *Trichophyton mentagrophytes*/*T. tonsurans*/*T. erinacei* Komplex

Basierend auf den Sequenzanalysen der ITS bilden innerhalb der Gruppe 1 (Abb. 7) die anthropophilen und zoophilen Spezies vier Hauptzweige, die sich aus dem *Trichophyton mentagrophytes*/*T. tonsurans* (A—D), dem *T. rubrum* (E), dem *T. erinacei* (F) und dem *M. canis* (G) Komplex zusammensetzen [7, Abb. 8]. Zunächst soll auf die beiden Hauptzweige A-D und F eingegangen werden.

Die Klade (F) enthält u. a. drei Stämme von *Arthroderma benhamiae* Ajello & Cheng, von denen zwei Typstämme sind und zwei *T. concentricum*-Isolate Blanchard, von denen das eine die Originalkultur von *Epidermophyton indicum* Castellani ist und die sich nur in einer Distanz von 5 bp unterscheiden. Die Pilze in dieser Gruppe, die die kürzeste Distanz zu *A. benhamiae* aufweisen, sind Sekundärisolate von *T. mentagrophytes* var. *erinacei* J.M.B. Smith & Marples und die Originalisolate von *T. proliferans* English & Stockdale sowie *T. eriotrephon* Papegaay.

Darüber hinaus können fünf weitere Kladen (A-D) differenziert werden. Die Kladen B und C enthalten zwei weitere teleomorphe Spezies in signifikanter Distanz voneinander, das Paratypisolat eines der beiden Mating-Partner von *A. vanbreuseghemii* Takashio und *A. simii* Stockdale et al. (3 Stämme, unter denen sich die beiden Typstämme befinden).

Die Klade D, die sich am nächsten zu *A. simii* befindet (Distanz von 6 bp) enthält 2 Sekundärisolate von Stämmen, die als *Trichophyton schoenleinii* (Remark) Nannizzi identifiziert wurden, aber auch die Typstämme von *T. langeronii* Baudet und *T. sarkisovii* Ivanova et Poliakova sowie je ein authentisches Isolat von *T. papillosum* Lebasque und *T. depressum* MacCarthy (identische ITS-Sequenzen), einschließlich der Varietäten *mentagrophytes* und *quinckeanum* MacLeod & Muende von *T. mentagrophytes* (Distanz von 4 bp).

Die Klade-A-Stämme sind paraphyletisch zu den Klade-B-Stämmen, unter denen sich das *Arthroderma vanbreuseghemii*-Isolat befindet. Die *Trichophyton tonsurans*-Gruppe A enthält u.a. die Typkulturen von *T. areolatum* Negroni, *T. floriforme* Beintema, *T. equinum* (Matruchot & Dassonville) Gedoelst var. *equinum*, *T. spadiceum* (Kato) Nannizzi, *T. equinum* var. *autotrophicum* J.M.B. Smith et al. und die Varietäten *sulfureum* (Sabouraud) Mackenzie von *T. tonsurans* sowie 4 weitere Sekundärisolate von *T. tonsurans*.

Klade B enthält *Arthroderma vanbreuseghemii*, aber auch Sekundär bzw. Originalisolate, die als *T. rotundum* MacCarthy, *T. krajdenii* Kane et. al, *T. candelabreum* Listemann, *T. batonrougei* (Castellani) de Vries & Cormane beschrieben wurden sowie die Varietäten *interdigitale* (Priestley) Moraes, *goetzii* Hantschke und *nodulare* Georg & Meachling von *T. mentagrophytes*.

Abbildung 8.

Phylogenetischer Baum auf Basis der ITS1, 5.8 S und ITS2 Sequenzdaten der Gruppe 1 Spezies. **Blau** umrandet sind die neuklassifizierten Spezies, einschließlich ihrer Teleomorphe.

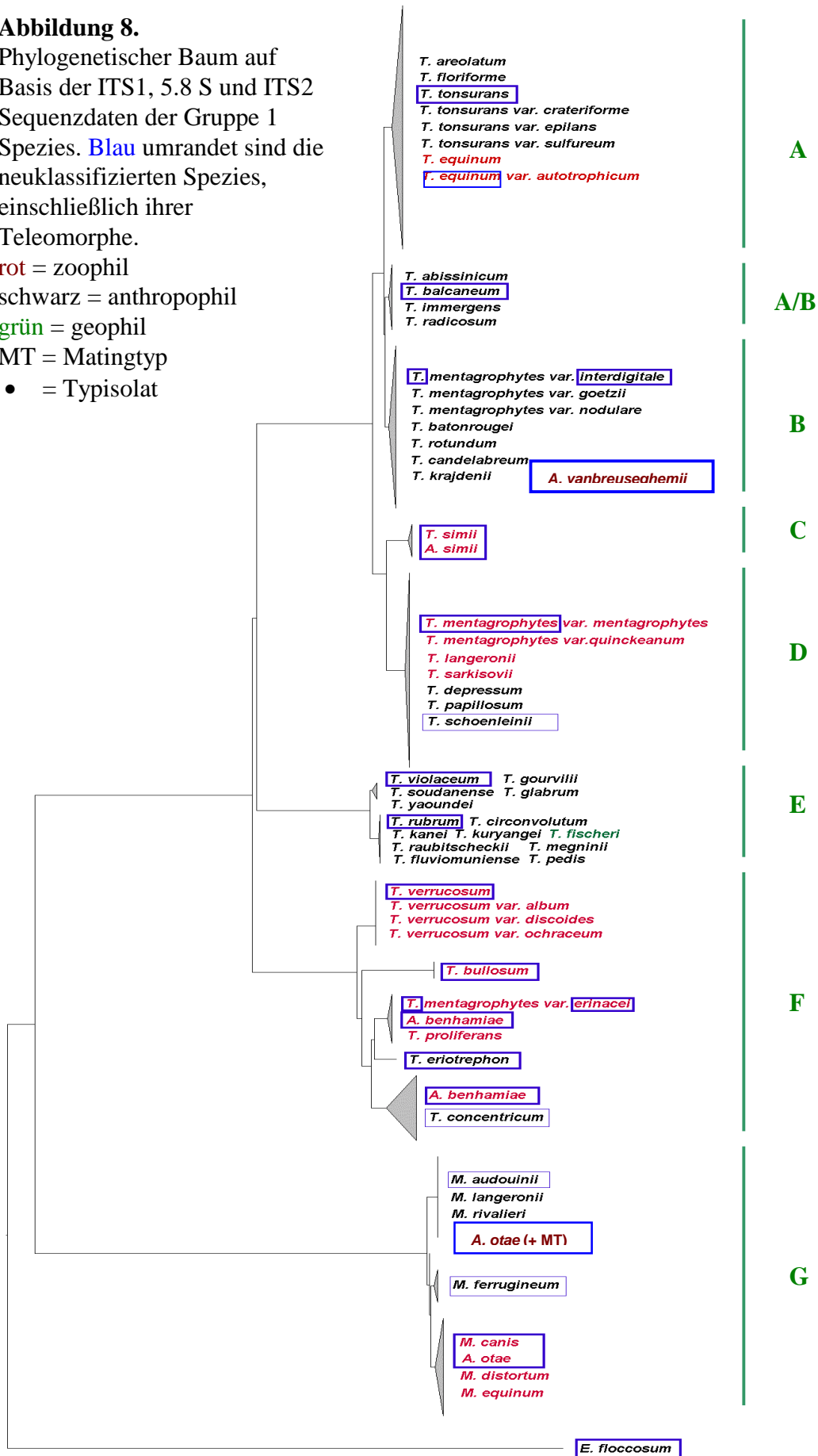
rot = zoophil

schwarz = anthropophil

grün = geophil

MT = Matingtyp

• = Typisolat



Die Gruppe A/B wird aus den Typkulturen der vier Spezies, *T. abissinicum* (Agostini) Nannizzi, *T. balcaneum* Castellani, *T. immergens* Milochevitch und *T. radicosum* Catanei gebildet.

Die Ergebnisse der PCR-Fingerprinting und AFLP-Datensets zeigen unabhängig vom verwendeten Primer/Primerpaar das gleiche Diskriminierungsniveau zwischen den untersuchten Varietäten und Spezies. Innerhalb der Gruppen A-B wurden mit den ca. 80 produzierten DNA-Fragmenten, 11 verschiedene Genotypen zu unterschieden, die den ITS-Kladen A, A/B und B entsprachen. Das Ähnlichkeitsniveau zwischen den Gruppen lag bei ca. 70 %, innerhalb jeder Gruppe (A, A/B vs. B) war es höher, zwischen 92 bzw. 100 %. Zwei Stämme, von denen der eine morphologisch als *T. mentagrophytes* var. *nodulare* und der andere als *T. krajdinii* in der CBS-Kollektion (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande) gelistet waren, konnten eindeutig als Fehlbestimmungen ausgewiesen werden und wurden als *T. rubrum* identifiziert [10].

Der Vergleich physiologischer Merkmale derselben Stämme auf *Trichophytonagar* zeigte keine nennenswerten Unterschiede und besitzt somit kein nutzbares Diskriminierungspotential. Mit Hilfe der Haarperforationsteste konnten lediglich die als *T. tonsurans* (A) identifizierten Stämme unterschieden werden, die nicht in der Lage waren zu perforieren. Urease wurde von allen Stämmen, mit Ausnahme der neuidentifizierten *T. rubrum*-Stämme gebildet.

Diskussion der neuen Nomenklatur

Innerhalb der beiden Hauptzweige, die dem *T. erinacei* (F)- und *Trichophyton mentagrophytes*/*T. tonsurans* (A-D)-Komplex entsprechen, war *T. mentagrophytes* bisher als eine anamorphe Art mit einer Anzahl von Mikrotaxa (6 Varietäten) bekannt, die gleichzeitig jedoch drei teleomorphe Arten unter sich vereinigte. Die molekularen Analysen zeigen jedoch, daß in Übereinstimmung mit der Diversität der Teleomorphspezies, diese Nomenklatur nicht aufrecht erhalten werden kann, da auch die phylogenetischen Distanzen zwischen den Mikrotaxa oft erheblich sind.

Die beiden Komplexe enthalten die drei Teleomorphe, welche *Arthroderma benhamiae*, *A. simii* und *A. vanbreuseghemii* sind. Die beiden monophyletischen Gruppen (A-D vs. F) sind durch 66 Substitutionen voneinander separiert. *Arthroderma benhamiae* liegt in Gruppe F, wohingegen *A. vanbreuseghemii* und *A. simii* in der Untergruppe B und C lokalisiert sind.

Die ITS-Sequenzdiversität innerhalb der besprochenen Gruppe F Spezies ist 21 Substitutionen und entspricht damit der Substitutionsrate, die in der Gruppe A-D gefunden wurde. Die Morphologie der beiden in der A-D Gruppe gefundenen Teleomorphe, *A. simii* und *A. vanbreuseghemii*, ist nahezu identisch. Deutliche Unterschiede in teleomorphen

Merkmale bestehen jedoch im Vergleich zu *A. benhamiae*. Das bedeutet, daß die morphologische Diversität der Teleomorphe hier durch die molekularen Daten akkurat reflektiert wird. *A. benhamiae* und *A. vanbreuseghemii* produzieren selten Gymnothezien. Das ist hauptsächlich auf die Prävalenz eines der beiden Mating-Partner zurückzuführen. Als Anamorph von *A. benhamiae* wird von Ajello & Cheng [Ajello, L. & Cheng, S.-L., 1967, *Sabouraudia* 5, 230-234] *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum* (Sabouraud) Neveu-Lemaire angegeben. Aber auch *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* befindet sich in diesem Cluster, ein Anamorph welches mit der afrikanischen, aber nicht der amerikanisch-europäischen Rasse von *A. benhamiae* sexuell kompatibel ist. Da die PCR-Fingerprinting-Muster sexuell kompatibler Stämme nachweislich nahezu identisch [7] sind, muß man auf Grund signifikanter genotypischer Unterschiede zwischen *A. benhamiae* und *A. benhamiae*/*T. mentagrophytes* var. *erinacei* annehmen, daß es sich hier um Schwesternspezies („sibling“ species; in teleomorphen Merkmalen keine Unterschiede, aber Mating-Barrieren) handelt. Diese Varietät von *T. mentagrophytes* ist phylogenetisch am weitesten von allen anderen entfernt und verdient somit in jedem Fall Speziestatus als *Trichophyton erinacei*. Diese Spezies ist durch einen positiven Haarperforationstest und birnen- bis tränenförmige Mikrokonidien charakterisiert, die sich deutlich von den Makrokonidien unterscheiden. Die Gruppe *Arthroderma benhamiae*/*Trichophyton erinacei* ist in erster Linie zoophil und kommt auf Igeln und Pferden vor.

Die Gruppen B-D repräsentieren mehr als eine Spezies, da wie schon angedeutet signifikante Mating-Barrieren zwischen *A. vanbreuseghemii* und *A. simii* existieren. Initiale Gymnothezien werden bei Kreuzungen manchmal gebildet, die F1-Generation ist aber immer steril. Physiologisch gibt es zwischen ihnen keine Unterschiede, kulturell und morphologisch können sie differenziert werden. Die Varietäten von *T. mentagrophytes*, die mit *A. vanbreuseghemii* clustern (*interdigitale*, *goetzii* und *nodulare*) bilden flaumige Kolonien und birnen- bis tränenförmige Konidien, wohingegen jene, die näher mit *A. simii* verwandt sind, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (Zopf) J.M.B. Smith & Austwick und *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* wie bei Malmsten beschrieben [Malmsten, P.H., 1845, *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. (J. Muller)* 1845-1848; 1-19, 1 pl. Stockholm, 1845, gr.8], granuläre Kolonien mit birnenförmigen bis runden Mikrokonidien bilden und durch die Anwesenheit von Spirallyphen gekennzeichnet sind. Die molekularen Ergebnisse unterstützen die morphologischen Unterschiede. Die flaumigen und granulären Varietäten von *T. mentagrophytes* sind mit Unterschieden im klinischen Bild assoziiert, sie differieren in Virulenzgrad, ökologischer Nische und Epidemiologie. Den flaumigen Typ isoliert man in der Regel von chronischen Infektionen, wohingegen der granuläre Typ primär akute und suppurative Dermatophytosen verursacht. Die letztere Form führt gehäuft in ländlichen Siedlungen zu Mykosen, da ihre bevorzugten Wirtsspezies Nagetiere sind. Die flaumige Variante ist dagegen mit *Tinea pedis* bei Stadtbewohnern assoziiert; d.h. anthropophil.

Daraus folgt, daß die flaumigen und granulären Varietäten von *T. mentagrophytes* jeweils eine erkennbare taxonomische Einheit darstellen, die durch klinische Prävalenz, phänotypische und molekulare Charakteristika differenziert werden können. Aus diesen Gründen wird neben *T. mentagrophytes* (granulärer Typ) der anamorphe Taxonname *Trichophyton interdigitale* (flaumiger Typ) wieder etabliert (Tab. 2). *T. interdigitale*- und *T. mentagrophytes*-Stämme repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit degenerierte Klone von *A. vanbreuseghemii* bzw. *A. simii*, die die Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion verloren haben. *Arthroderma simii* ist auf den indischen Subkontinent beschränkt und wird vor allem bei Affen isoliert, wo er gelegentlich zu Mykosen führt. Solche Stämme sind durch kurze bis birnenförmige Mikrokonidien und das Fehlen von Spirallyphen ausgezeichnet.

Näher mit den zoophilen Varianten von *T. mentagrophytes* verwandt, sind die als *Trichophyton schoenleinii* (D, anthropophil) identifizierten Stämme im Vergleich zu den anthropophilen (*T. interdigitale*) und zoophilen Varianten (*T. mentagrophytes*) untereinander. *T. schoenleinii* differiert nur um 3 Mutationen von dem auf Nagetieren beheimateten *T. mentagrophytes*, einschließlich *T. langeronii* und *T. sarkisovii*, die man auf Kamelen gefunden hat. Als anthropophile Spezies bekannt, würde man bei *T. schoenleinii* eher milde chronische Infektionen erwarten, das typische Krankheitsbild, der sogenannte "Favus" zeigt aber im Gegenteil einen schwereren Verlauf. Morphologisch unterscheidet sich *T. schoenleinii* von den zoophilen Taxa der Gruppe durch den Verlust der Sporulation. Die typischen hirschgeweiartigen Hyphen werden dagegen von allen Spezies gebildet. Auch die Analyse zusätzlicher genomischer Bereiche erbrachte stets minimale Unterschiede zwischen diesen beiden ökologisch definierten Gruppen. Ihr Speziesstatus ist gerechtfertigt. Alle zoophilen Taxa dieser Gruppe wurden auf Grund identischer Genotypen mit *T. mentagrophytes* synonymisiert (Tab. 2).

Gruppe A, die u.a. Varietäten von *T. tonsurans* enthält, hat sich vermutlich asexuell, durch Drift weiter von *A. vanbreuseghemii* entfernt; kein unmittelbares Teleomorph ist bekannt. Diese Spezies unterscheidet sich morphologisch von den bisher besprochenen durch variable Mikrokonidien, die graduell in Makrokonidien aufgehen. *Trichophyton tonsurans* ist ein anthropophiler, hochkontagiöser Pilz, dessen Inzidenz im Ansteigen begriffen ist und der immer häufiger Tinea capitis-Epidemien auslöst [Hay et al., 2000, Meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM), Barcelona]. Seine Varietäten zeigen ein ähnlich klinisches Verhalten. Die ITS-Sequenzen sind homogen, minimale Unterschiede zeigen die hochvariablen Regionen, die aber nicht variantenspezifisch sind [19]. Aus diesem Grund ist die Differenzierung in Varietäten überflüssig. Auch *Trichophyton equinum* und seine Varietäten wurden in diesem Cluster gefunden. Eine Spezies, die primär bei Dermatophyten des Pferdes isoliert wird, zoophil ist, nachweislich aber auch auf den Menschen übertragen wird. Die Untersuchung zusätzlicher Genomregionen hat gezeigt, daß sich *T. tonsurans* und *T. equinum* Stämme unterscheiden lassen, deshalb bleiben diese Spezies

in Übereinstimmung mit ihren ökologischen und morphologischen Charakteristika bestehen (Tab. 2).

Die vier Spezies, *T. abissinicum*, *T. immergens*, *T. radicosum* und *T. balcaneum* (A/B), die untereinander identisch waren, positionieren sich intermediär zu *T. interdigitale* und *T. tonsurans*. Allerdings clustern sie auf Basis der ITS-Daten eher mit ersterer Spezies (Abb. 8). Die variablen DNA-Fragmente zeigen ein gegenteiliges Verhalten. Um weitreichende Nomenklaturänderungen durchzuführen, müssen andere Genomregionen untersucht werden.

Auf Basis molekularer Daten wurden die sieben folgenden Spezies innerhalb des *T. tonsurans*/*T. mentagrophytes*/*T. erinacei*-Komplexes etabliert: *T. interdigitale*, *T. erinacei*, *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. mentagrophytes*, *T. schoenleinii* und *T. simii*. *Trichophyton tonsurans*, *T. mentagrophytes* und *T. schoenleinii* sind die klassischen Spezies unter ihnen und gehören zu den ersten beschriebenen Dermatophyten des vergangenen Jahrhunderts. Alle nicht erwähnten Taxa wurden mit ihnen synonymisiert und entsprechen den ausgeführten Differenzierungsmerkmalen. Sie stellen alte Speziesnamen dar, die bereits auf Grund morphologischer Merkmale ungültig waren (Tab. 2).

Es erscheint ganz logisch, daß solche Spezies, wie *T. interdigitale*, bereits vor hundert Jahren entdeckt wurden und noch heute verbreitet sind. Sie führen vor allem zu Tinea pedis-Infektionen (Athletenfuß). Die Inzidenz einiger akut inflammatorischer, zoophiler Taxa wie *T. mentagrophytes* ist dagegen gesunken, denn sie sind mit ländlicher Umgebung und Lebensbedingungen (enger Kontakt mit Nagetieren) assoziiert, die sich in den letzten Jahrzehnten drastisch geändert haben. Die ökologische Nische von *Trichophyton erinacei* und *T. simii* sind wilde Tiere. Das erklärt die noch geringere Inzidenz solcher Spezies, denn sie haben eine noch geringere Chance auf den Menschen übertragen zu werden und diesen zu infizieren [7].

4.1.2.2 Der *Microsporum canis* Komplex

Der Hauptzweig G (Abb. 8) umfaßt die wenigen Arten des *M. canis*-Komplexes. Dieser Komplex ist vergleichbar mit dem *T. mentagrophytes* Komplex, wo zoophile und anthropophile Spezies eine enge Verwandtschaft zeigen. Vertreter der letzteren Art sind *M. audouinii*, *M. langeronii*, *M. rivalierii* und *M. ferrugineum* [2]. Die beiden Mating-Partner („+“ und „-“, Matingtyp) der teleomorphen Spezies von *M. canis*, *Arthroderma otae* unterscheiden sich durch 3 Substitutionen innerhalb der ca. 500 bp langen ITS-Region. Damit kann man als intraspezifische Variation eine Substitutionsrate von ca. 0.6 % annehmen. Die Distanz zwischen dem (-) Mating-Partner von *A. otae* und den 4 *M. ferrugineum*-Stämme betrug nur 2 Transitionen. Sie sind phylogenetisch am nächsten mit *M. canis* verwandt. Die untersuchten 8 Stämme von *M. audouinii*, *M. langeronii* und *M. rivalierii*, die eine separate

Gruppe bilden, waren untereinander identisch und nur durch eine Transition vom (+) Mating-Partner von *A. otae* getrennt. Alle zoophilen Taxa, *M. distortum*, *M. equinum*, inklusive *M. canis* (7 Stämme) stimmten genotypisch mit dem (-) Mating-Partner von *A. otae* überein. Die größte Distanz wurde zwischen den anthropophilen Spezies, *M. ferrugineum* und *M. audouinii* gefunden (4 Transitionen und 1 Insertion/Deletion von 3 Nukleotiden). Bis auf *M. equinum*, wo nur Sekundärisolate verfügbar waren, umfaßten die untersuchten Stämme der restlichen Arten jeweils ein authentisches Isolat.

AFLP- und PCR-Fingerprinting-Daten unterstützen auch hier die Topologie des ITS-Baumes, obwohl das Diskriminierungspotential zwischen den 3 Gruppen (*M. audouinii*, *M. canis*, *M. ferrugineum*) größer war. Hinsichtlich der physiologischen Profile konnte nur zwischen stoffwechselaktiven (zoophile Taxa) und nicht aktiven (anthropophile Taxa) Stämmen unterschieden werden, wobei erstere auch in der Lage waren, Haare zu perforieren, die letzteren dagegen nicht. Die Ureaseteste waren schwer zu interpretieren. Sporulation wurde vor allem in den stoffwechselaktiven Stämmen nachgewiesen.

Diskussion der neuen Nomenklatur

Wenn man zugrunde legt, daß 0.6 % ITS-Sequenzdivergenz innerhalb der beiden interfertilen Stämme von *A. otae* zugelassen wird, dann würden auch *M. ferrugineum* (Substitutionsrate von 0.4% zum „–“, MT) und *M. audouinii*-Stämme (Substitutionsrate von 0.2% zum „+“ MT) zur gleichen biologischen Spezies, *A. otae*, gehören, also konspezifisch sein. Die mit *M. canis* genotypisch eng verwandten Taxa (*M. distortum*, *M. equinum*) sind jedoch zoophil, die der anderen (*M. ferrugineum* und *M. audouinii*, einschließlich *M. langeronii* und *M. rivalieri*) dagegen anthropophil. Die beiden anthropophilen Spezies (*M. ferrugineum* und *M. audouinii*) evolvierten höchstwahrscheinlich durch Spezialisierung auf und mit dem menschlichen Wirt weiter. Eine Spezialisierung durch geographische Isolation ist nicht anzunehmen, da die Stämme einer Spezies jeweils aus 3 Kontinenten stammen. Die Daten zeigen weiterhin, daß diese beiden Spezies unabhängig voneinander evolvierten, *M. audouinii* vom (+) Matingtyp und *M. ferrugineum* vom (-) Matingtyp von *A. otae*, denn die Distanz zwischen ihnen ist größer als zu und zwischen den Matingtypen von *A. otae*. Unterstützt wird diese Vorstellung auf Basis der Anpassung an den Menschen auch durch die Befunde, daß die humanassoziierten Taxa zu Sporulationsverlust tendieren und humane *M. canis*-Infektionen einen höheren Entzündungsgrad zeigen, als jene verursacht durch *M. audouinii* oder *M. ferrugineum*.

Separate Spezies sollten vor allem dann unterschieden werden, wenn sie durch solche Kriterien wie klinische, morphologisch/physiologische, ökologische und molekulare Merkmale differenziert werden können. Eine alleinige Bewertung von Distanzraten sollte nicht erfolgen. Aus diesem Grunde wurden nur die Epithete *distortum* und *equinum* mit *canis*,

langeronii und *rivalierii* mit *audouinii* synonymisiert, die mit *ferrugineum*, die ältesten Epithete innerhalb ihrer Gruppen sind. Der Speziesstatus dieser Taxa sollte auf Grund der ausgeführten Unterschiede erhalten bleiben [8, Abb. 8].

4.1.2.3 Der *Trichophyton rubrum* Komplex

Der Hauptzweig E umfaßt Spezies und Varianten, die identisch oder nah mit *T. rubrum* verwandt sind (Abb. 8, Tab. 2). Dieser Zweig teilt sich in zwei Gruppen, wobei die eine mit Sekundärisolaten von *T. glabrum* Sabouraud, *T. gourvilii* Catanei, *T. soudanense* Joyeux, *T. yaoundei* Cochet & Doby-Dubois, *T. violaceum* Bodin und seiner Varietät *indicum* Acton & McGuire (Typstamm) durch 7 Polymorphismen von der anderen, die u.a. Originalisolate von *T. rodhainii* Vanbreuseghem, *T. fischeri* Kane, *T. raubitschekii* Kane et al., *T. kanei* Summerbell, *T. kuryangei* Vanbreuseghem & Rosenthal, *T. fluviomuniense* Miguens sowie Sekundärisolate von *T. circonvolutum*, *T. pedis* Ota, *T. rubrum* (Castellani) Sabouraud (einschließlich der var. *nigricans*) Sabouraud und *T. megninii* Blanchard einschließt, getrennt ist.

Die Ergebnisse der PCR-Fingerprinting und AFLP-Analysen bestätigen auch hier prinzipiell die Resultate des ITS-Baumes, obwohl auf einem Ähnlichkeitsniveau von 88% innerhalb des zweiten Clusters eine Untergruppe unterschieden werden konnte, die *T. kuryangei*, *T. concentricum* und *T. megninii* enthielt. Auf Grundlage von 5 unterschiedlichen Primersets wurden insgesamt 65 Fragmente generiert, mit denen bis auf eine Ausnahme 3-4 Genotypen diskriminiert werden konnten [18]. Mit Hilfe der physiologischen Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Taxa gefunden werden.

Diskussion der neuen Nomenklatur

Im Hauptzweig E sind alle Taxa als obligat pathogen bekannt und bei keinem von ihnen wurde bisher ein Teleomorph gefunden, noch befindet sich eine *Arthroderma* Spezies in relevanter Distanz. Dieser Umstand ist bis auf die ebenfalls anthropophile Spezies *E. floccosum* einzigartig innerhalb der Dermatophyten und könnte das Ergebnis einer rasanten Evolution sein, deren offensichtliches "Bottleneck" für die Gruppe um *T. rubrum* das Mikroklima im geschlossenen Schuh (warm und feucht) war [18]. Dafür spricht auch, daß die Inzidenz solcher Stämme während des 19. Jahrhunderts sprunghaft anstieg und vor allem während des zweiten Weltkrieges ihre Verbreitung fand. Die Taxa dieser Gruppe sind insbesondere als Erreger von Tinea pedis und Onychomykose bekannt, Tinea corporis Infektionen sind eher selten. Die Taxa der anderen Gruppe (um *T. violaceum*) führen dagegen in der Regel zu Tinea capitis. Diese Gruppe ist in ihrer Verbreitung auf Afrika beschränkt, die *T. rubrum*-Gruppe ist hingegen weltweit zu finden. Obwohl physiologisch nicht zu

diskriminieren, findet man neben molekulargenetischen, genügend Merkmale auf morphologischer Ebene, mit denen beide Gruppen differenziert werden können. Da *violaceum* bzw. *rubrum* die ältesten Epithete darstellen, wurden alle anderen Spezies mit ihnen synonymisiert [10]. Morphologisch lassen sie sich folgendermaßen unterscheiden.

T. violaceum: Langsam wachsende Kolonien, die keine Makrokonidien ausbilden.

Mikrokonidien sind tränenförmig, wenn sie produziert werden. Sich reflexiv verzweigende Hyphen (*T. soudanense*) und Chlamydosporen (*T. yaoundei*) können vorhanden sein. Der Ureasetest ist positiv, der Haarperforationstest ist negativ.

T. rubrum: Langsam wachsende Kolonien, die selten Makrokonidien ausbilden, dann variabel in Form sind. Birnen- bis tränenförmige Mikrokonidien sind in der Regel vorhanden. Der Ureasetest ist positiv, der Haarperforationstest ist negativ.

4.2 Die Evolution innerhalb der Gattung *Arthrodermataceae*

Die Keratinolyse ist die Eigenschaft, die die drei Familien (*Onygenaceae*, *Gymnoascaceae*, *Arthrodermataceae*, Abb. 1) auszeichnet und innerhalb des gesamten Pilzreiches nur einmal erworben wurde [Currah, R.S., 1985, Mycotaxon 24, 1-216]. Die vierte Familie, *Myxotrichaceae*, ist zellolytisch und der Ordnung der *Onygenales* wie auf Basis von 18S Sequenzanalysen gezeigt wurde [Sugiyama, M. et al., 1999, Mycoscience 40, 251-258], nicht mehr zuzuordnen.

Die molekularen Studien zeigen, daß die phylogenetisch ältesten Dermatophytenpezies geophil sind. Die meisten sind thermotolerant, eine ist jedoch strikt psychrophil. Das läßt den Schluß zu, daß sich die wärmeliebenden, zoophilen Arten erst später durch Koevolution mit warmblütigen Vögeln und Tieren, aus den geophilen Arten entwickelt haben.

Die anthropophilen scheinen dagegen erst mit Entstehung des Menschen evolviert und demzufolge am jüngsten zu sein. Damit kann man ihre geringe Biodiversität und ihr verändertes pathogenetisches Verhalten zu erklären (vgl. Abb. 7). Man kann sich gut vorstellen, daß das Ansteigen der Transmissionsrate durch die Verlängerung der Infektionszeit des Wirtes Ausdruck der Optimierung der "pathogenen" Fitnis der Vorfahren dieser Erreger nach Besiedlung der neuen Nische "Mensch" war.

4.3 Applikation für die medizinisch-mykologische Diagnostik und Epidemiologie

Dermatophytosen sind weltweit verbreitet und zeigen mit die höchste Inzidenz unter den Infektionskrankheiten. Eine schnelle und akkurate Identifizierung des ätiologischen Agens solcher Infektionen ist auf Grund der ständig wachsenden Zahl von Antimykotika mit verschiedenen Aktivitätsspektren notwendig. Die neueren Azole zeigen beispielsweise

unterschiedliche minimale Hemmkonzentrationen für morphologisch schwer zu differenzierende Dermatophytenarten wie *T. rubrum* und *T. interdigitale*.

Ein anderer zwingender Grund ist, daß sich das Erregerspektrum der Dermatophyten dynamisch verändert [Tietz, H-J. et al., 1995, Mycoses 38, 33-39]. Obwohl anthropophile Erreger wie *T. rubrum* und *T. interdigitale* derzeit die weltweit verbreitetsten

Dermatophytenarten darstellen, ist die Inzidenz zoophiler Taxa wie *M. canis* in Zentraleuropa und Amerika in den letzten Jahren drastisch gestiegen [Hay et al., 2000, Meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM), Barcelona]. In der klinischen Mykologie werden Dermatophyten, wie unter Pkt. 2.3.1 ausgeführt traditionell auf Basis morphologischer Merkmale bestimmt, die u.U. (Subkultivierung, Therapie) schlecht exprimiert werden können und dann unzuverlässig sind. Die Ausbildung morphologischer Charakteristika ist zudem langwierig und erfolgt erst nach 2-4 Wochen.

Dazu kommt, daß z.B. aus ca. 30% des klinischen Materials von Onychomykose-Patienten (Nägel), obwohl mikroskopisch Hyphen zu diagnostizieren sind, der Erreger nicht kultivierbar ist. Eine Speziesbestimmung ist somit nicht möglich. Molekulare Methoden sind nicht nur leichter reproduzierbar, da sie von der phänotypischen Expression unabhängig sind, sondern auch zeitsparender, da der Erregernachweis direkt aus dem klinischen Material möglich ist.

Durch die Möglichkeit der Amplifikation spezifischer genomischer DNA werden nur wenige Zellen des Erregers benötigt, um ihn zu diagnostizieren. In solchen Detektionssystemen werden oft Universalprimer in der PCR genutzt, wobei die entsprechende Spezies dann über spezifische Sonden (Oligonukleotide) z. B. im Dot-Blot-Verfahren nachgewiesen werden kann. Unsere Studien konnten zeigen [20-21], daß man auf der Basis der ITS-Region der rDNA die klinisch relevanten Dermatophytenarten diskriminieren kann und demzufolge der Etablierung eines solchen PCR-Nachweissystems auf Grundlage pilzspezifischer Primer in Verbindung mit dermatophytenspezifischen Sonden in der Praxis prinzipiell nichts im Wege steht [22]. Allerdings muß beachtet werden, daß die Anzucht des Erregers derzeit noch nötig ist, um die Resistenztestung gegenüber Antimykotika durchzuführen.

Wir evaluierten das beschriebene System zunächst für den Nachweis von *T. rubrum* aus kultiviertem Material. Die ITS-Region wurde mit den pilzspezifischen Primern SR6R und LR1 amplifiziert. Für den Erregernachweis wurde eine Digoxigenin-markierte Oligonukleotidsonde verwendet, deren Sequenz aus der ITS2-Region ausgewählt wurde, da nur hier ausreichend Polymorphismen auftraten, um *T. rubrum* von *T. violaceum* zu diskriminieren.

Für andere Dermatophytenarten eignet sich aber auch die ITS1 als Grundlage für ein solches Detektionssystem. Die Spezifität der Sonde wurde an Hand von 13 verschiedenen eukaryontischen Mikroorganismen (Spezies der Gattungen *Candida*, *Scopulariopsis*,

Leishmania usw.) getestet, die auch kutane Hautinfektionen verursachen können und die differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden müssen. Bakterien besitzen keine vergleichbare ITS-Region und werden somit von vornherein nicht amplifiziert. Weiterhin wurden 55 verschiedene Spezies und Varietäten innerhalb der Dermatophyten und 50 klinische Isolate getestet. Mit der „*T. rubrum*-Sonde“ wurden Hybridisierungssignale ausschließlich für die *T. rubrum*-Stämme nachgewiesen, d.h. es erfolgte keine Kreuzhybridisierung mit anderen Spezies. Die entwickelte Sonde war also nachweislich speziesspezifisch. Auch für humane DNA, die mit humanspezifischen Primern (DXYS156X und DXYS156Y) amplifiziert wurde, konnte eine Kreuzhybridisierung ausgeschlossen werden.

Wenn genomische Pilz-DNA (20-25 ng) ohne vorherige Amplifikation eingesetzt wurde, waren nur schwache Hybridisierungssignale für *T. rubrum* erkennbar. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Amplifikation der Zielsequenz essentiell ist, um die Sensitivität des Nachweissystems zu steigern. Auf der anderen Seite ist eine Speziesdiagnose, die nur auf der Größe der zuvor amplifizierten DNA-Fragmente beruht unsicher, da sich diese wie bei den am häufigsten infizierenden anthropophilen Arten, *T. rubrum* und *T. interdigitale* nicht unterscheiden lassen. Allerdings lassen sich auf diesem Wege im Vorfeld andere Pilze wie z.B. *Scopulariopsis*, *Candida* oder Protozoen wie Leishmanien sowie Dermatophyten der Gattungen *Microsporum* und *Epidermophyton* als ätiologisches Agens ausschließen, da deren Amplifikate eine andere Größe haben.

Speziell bei Nägeln ist das Problem eine ausreichende Keratolyse zu erreichen, um die DNA aus dem Pilzmyzel extrahieren zu können. Die Amplifizierung von DNA aus 35 Nagelmaterialien, die von Onychomykose-Patienten gewonnen wurden und mikroskopisch positiv waren, erzielte nur in ca. 30 % ein Hybridisierungssignal, unabhängig davon welche DNA-Präparationsmethode genutzt wurde. Ungefähr 70 % der Proben blieben auf Grund unzureichender DNA-Mengen negativ. Obwohl die getesteten Extraktionsmethoden für den Nachweis von *T. rubrum* aus Nagelmaterial nicht optimal sind, kann das entwickelte Nachweissystem für die Detektion dieses Erregers bei der seltener auftretenden Tinea corporis-Infektion genutzt werden, da die Gewinnung von DNA aus Hautschuppen kein Problem darstellt. Die Vorteile eines PCR-Nachweissystems für Dermatophyten liegen auf der Hand. Anders als bei der mikroskopischen Identifizierung werden keine speziellen Erfahrungen benötigt. Zweitens können Fehlbestimmungen des Erregers vermieden werden. Auch wenn die Erreger aus dem klinischen Material zuvor kultiviert werden müssen, ist eine Diagnosestellung über ein solches Nachweissystem schneller, da DNA-Mengen aus Frühkulturen, die noch nicht sporulieren ausreichend sind [20]. Beachtet muß dabei werden, daß die Anwendung molekularer Techniken für den Nachweis von Dermatophyten aus klinischem Material nicht unumstritten sind, da Haut, Schuppen und Haare keine sterilen Materialien darstellen. So könnten z.B. Arthrokonidien im Haar von nichtinfizierten Kindern

nachgewiesen werden. In diesem Fall wäre die PCR nicht in der Lage zwischen Kontamination und Infektion zu differenzieren. Eine größere klinische Studie ist nötig, um die Aussagefähigkeit der PCR endgültig zu bestimmen.

Für epidemiologische Untersuchungen von Infektionskrankheiten stellen molekularbiologische Untersuchungen aber schon heute die Methode der Wahl dar. Die Epidemiologie der Dermatophyten basiert bisher wie schon erwähnt auf ihren klinischen und ökologischen Charakteristika. Fragen, die die Typisierung von Isolaten innerhalb der Spezies betreffen, blieben dabei auf Grund des für diese Pilzgruppe nicht ausreichenden Differenzierungspotentials der angewendeten Methoden unbeantwortet. Wenn jedoch anthropophile Dermatophyten über gemeinsam benutzte Haarbürsten, Kopfbezüge und Mützen oder über den Fußboden in Schwimmbädern und Sporthallen übertragen werden, ist die wechselseitige Infektion von Menschen, die zusammen leben wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang stellt sich dann auch die Frage, ob Therapieversager bei zuvor behandelten Onychomykose-Patienten, auf Infektion mit dem gleichen Stamm (Resistenz!) oder mit einem neuen Stamm (Neuinfektion) zurückzuführen sind. Das gleiche gilt auch für den veterinärmedizinischen Bereich. *M. canis* wird z.B. aus dem Fell jeder fünften klinisch gesunden Katze isoliert [Böhm, K.H. et al., 1996, Kleintierpraxis 41, 483-491]. Aber auch 84% der Dermatophytosen bei Hunden sind auf diesen Erreger zurückzuführen [Böhm, K.H. et al., 1996, Kleintierpraxis 41, 483-491]. Diese latent infizierten Tiere stellen eine zunehmende Infektionsgefahr für Menschen und Tierbestände dar. In einigen Regionen Deutschlands werden drei von vier menschlichen Dermatophytosefällen von Katzen verursacht [Böhm, K.H., 1994, Kleintierpraxis 39, 111-113]. Wenn man in der Lage ist, einzelne Isolate voneinander zu unterscheiden, kann man Maßnahmen zur Unterbrechung von Infektionsketten in Tierheimen und Rassekatzenzuchten empfehlen und so auch forensische Fragestellungen klären, die sich auf Grund der hohen finanziellen Kosten für die Behandlung von Tieren sowie für die Desinfektion der Räume und Gegenstände ergeben [Griffin, C.E., 1993, Small Animal Medicine, Proc. North Amer. Vet. Conference, Orlando].

Auch bei den Dermatophyten stellt sich die Frage, ob bestimmte Stämme durch ein höheres Virulenzpotential ausgezeichnet sind. Das PCR-Fingerprinting [1, 11, 16, 19], die Analyse anonymer populationsgenetischer Marker [18] sowie RAPD- [Kac, G. et al., 1999, Br. J. Dermatol. 1140, 839-844], AFLP- [18] und RFLP-Techniken [auf Basis der NTS-Region des ribosomalen Operon, Jackson, C.J. et al., 1999, J. Clin. Microbiol. 37, 931-936] waren bisher nicht oder nur ganz begrenzt in der Lage, DNA-Polymorphismen zwischen eng verwandten Stämmen aufzuzeigen. Dabei muß auch beachtet werden, daß die RAPD-Technik zwar eine sehr sensitive Methode ist, was den Nachweis intraspezifischer Variabilität beriff, daß deren Reproduzierbarkeit aber kritisch zu bewerten ist. Die gefundenen Genotypen ließen sich jedoch weder mit der geographischen Herkunft der Isolate, noch mit dem verursachten Krankheitsbild oder anderen epidemiologisch relevanten Merkmalen korrelieren. Ein gutes

Drittel der untersuchten *T. interdigitale* und *T. rubrum*-Isolate zeigte unabhängig von der angewendeten Methode identische Genotypen. Diese Resultate unterstützen die These, daß besonders adaptierte Klone innerhalb der anthropophilen Dermatophyten existieren, die weltweit verbreitet sind. Die Antwort auf die Frage, ob unterschiedliche Klone wirklich existent sind und wenn ja, auch einen Selektionsvorteil hinsichtlich einer erhöhten Virulenz und Infektiosität besitzen, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten. Diese sollten sich auf solche molekularen Marker beschränken, die einer erhöhten Mutationsrate (10^{-2} bis 10^{-5}) wie Mikrosatelliten-DNA unterliegen.

5. Abschließende Diskussion und Ausblick

Warum das pathogene Potential einiger Erreger höher ist als das anderer interessiert nicht nur medizinische Mikrobiologen seit langem. Dafür mag es sicher mehrere Gründe geben. Zwei Faktoren, die Art der Übertragung sowie die Überlebenszeit des Keimes außerhalb eines Wirtsorganismus spielen bei der Optimierung der "pathogenen" Fitnis eines Erreger eine entscheidene Rolle. Auch das menschliche Verhalten (z.B. Bevölkerungsbewegungen, Wohnverhältnisse) trägt sicherlich, obwohl bisher kaum beachtet, entscheidend zur Evolution von Krankheitserregern bei, da es häufig den Weg und die Geschwindigkeit der Übertragung bestimmt. Wenn man die Mechanismen versteht, die Veränderungen in der Virulenz hervorrufen, könnte man dieses Wissen gezielt zur Vorbeugung nutzen. Es wäre möglich, virulente und avirulente Stämme zu unterscheiden und diese dann gezielt für die Entwicklung von Impfstoffen einzusetzen. Solche Ansätze wären insbesondere auch für die Veterinärmedizin (Haustiere und Großtierhaltung) von Interesse. Da Virulenzdeterminanten die Überlebenschancen eines Erregers in einem Wirt erhöhen, unterliegen sie der Selektion/Evolution. Dies führt auch zu Veränderungen in genetischen Polymorphismen (Aufrechterhaltung bzw. Verlust) des Erregers.

Neben der Therapie ist es ein Anliegen medizinischer und veterinärmedizinischer Intervention Virulenz zu reduzieren. Aber ein derartiger Eingriff könnte natürlich auch eine Selektion in Richtung erhöhter Virulenz bewirken. Wenn Virulenz als Folge von Selektion einerseits die Fitnis und andererseits die Transmission pathogener Erreger optimiert, dann können auch weniger virulente Erreger durch Selektion erhalten bleiben, weil sie wie bei der Myxoma-Kaninchen-Infektion nicht so schnell vom Wirt eliminiert werden. Bei dieser Infektion dominieren Stämme mit intermediärer Virulenz in wilden Kaninchenpopulationen. Der Vorteil besteht darin, daß auf diese Weise der Zeitraum, während dessen der Wirt infektiös ist und der Erreger somit erfolgreich übertragen werden kann, verlängert wird. Extrem virulente Stämme dagegen töten ihre Wirte schnell und tote Kaninchen sind nicht mehr infektiös. Die Infektionszeit ist auch für nur schwach virulente Stämme verkürzt, da das Immunsystem der Kaninchen die Infektion schnell kontrolliert und das Virus umgehend

eliminiert wird. Wenn nun aber die Impfung einigen Wirten einen teilweisen Schutz verleiht, der diese Population in die Lage versetzt, den in diesem Fall intermediär virulenten Erreger schneller zu eliminieren, dann könnte durch Selektion auch eine Virulenzsteigerung (bei gleichzeitiger Steigerung der Transmissionsrate) und nicht eine weitere Abschwächung bewirkt werden und zwar proportional zur Entstehung geimpfter Individuen innerhalb der Wirtspopulation. Es gibt ganz generell genug Hinweise, die uns zeigen, daß veränderte Umgebungsbedingungen (z.B. Ansteigen der Anzahl immungeschwächter Wirte, höhere Populationsdichte oder neue Behandlungsregime) die Virulenz beeinflussen können. Wenn wir das Selektionsregime, das für das derzeitige Virulenzniveau von pathogenen Erregern verantwortlich ist nicht verstehen, können wir auch die Konsequenzen, die solche Veränderungen bewirken können nicht vorhersagen.

Wenn die Phylogenie der Dermatophyten als Ergebnis einer Evolution die Anpassung von keratinophilen Pilzen an verschiedene Standorte und insbesondere an die ökologische Nische „Mensch“ beschreibt, dann sind die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit ein Schritt zum Verständnis dieses Wechselspiels zwischen Mikroorganismen und ihren ökologischen Nischen, seien sie nun belebt oder unbelebt. Insbesondere bei der Neubesiedlung von belebten Standorten wie z.B. dem Menschen kommt den Virulenzmerkmalen eine Schlüsselrolle zu. Neben der potentiellen Nutzung der Ergebnisse dieser Arbeit für die Diagnostik, Therapie und Epidemiologie können DNA-Polymorphismen aber auch Hinweise auf wichtige Genomabschnitte/Eigenschaften liefern, in denen wir den Schlüssel für die Anpassung/Virulenz von Erregern sehen müssen.

II. Publikationen zur ausführlichen Zusammenfassung

1. **Gräser, Y.,** El Fari, M., Presber, W. & Tietz, H.J. (1998). Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. Br. J. Dermatol. 138, 576-582.
2. **Gräser, Y.,** El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A.F.A., De Hoog, G.S., Presber, W. & Tietz, H.J. (1999). Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ITS region. Med. Mycol. 37, 105-114.
3. **Gräser, Y.,** Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T.G. & Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 12473-12477.
4. Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H.J., Meyer, W., **Gräser, Y.,** Tausch, I., Presber, W., and Mitchell, T.G. (1993). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with polymerase chain reaction. Mycoses 36, 171-179.
5. **Gräser, Y.,** Tietz, H.J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G., Forche, A., Presber, W. & Schönian, G. (1997) Detection and Application of DNA Polymorphisms to Identify Species and Strains of *Candida* and to Analyze the Population Structure of *C. albicans*. Microbiol. Cult. Coll. 13, 11-20.
6. Vilgalys, R., **Gräser, Y.,** Schönian, G., Presber, W. & Mitchell, T.G. (1997). Response to „Are *Candida albicans* natural populations subdivided?“ Trends Microbiol. 5, 253-256.
7. **Gräser, Y.,** Kuijpers, A.F.A., Presber, W. & De Hoog, G.S. (1999) Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. Med. Mycol. 37, 315-330.
8. **Gräser, Y.,** Kuijpers, A.F.A., El Fari, M., Presber, W. & De Hoog, G.S. (2000) Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. Med. Mycol. 38, 143-153.
9. **Gräser, Y.,** de Hoog, G.S. & Kuijpers, A.F.A. (2000) Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. In: Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Eds. RKS Kushwaha & J Guarro, Bilbao, País Vasco, Spain. Revista Iberoamericana de Micología 17 (Suppl.), p. 17-21.

10. **Gräser, Y.**, Kuijpers, Presber, W. & De Hoog, G.S. (2000). Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. J. Clin. Microbiol. 38, 3329-3336.
11. Kielstein, P., Wolf, H., **Gräser, Y.**, Buzina, W. & Blanz, P. (1998): On the variability of *Trichophyton verrucosum* isolates from vaccinated herds with ringworm of cattle. Mycoses 41, Suppl. 2, 58-64.
12. Rainer, J., Wedde, M., De Hoog, G.S., **Gräser, Y.** & Gilges, S. (2000) Molecular variability of *Pseudoallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. J. Clin. Microbiol. 38, 2802-3273.
13. **Gräser, Y.**, Meyer, W., Halle, E., Presber, W. & Schönian, G. (1993) Optimization of a PCR-based assay for fingerprinting microorganisms. Med. Microbiol. Lett. 2, 379-385.
14. Schönian, G., Schweynoch, C., Zlateva, K., Oskam, L., Kroon, N., **Gräser, Y.**, & Presber, W. (1996) Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 19-29.
15. **Gräser, Y.**, Klare, I., Halle, E., Gantenberg, R., Buchholz, P., Jacobi, H.D., Presber, W. & Schönian, G. (1993) Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak using PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 31, 2417-2420.
16. Kielstein, P., Wolf, H., **Gräser, Y.**, Buzina, W. & Blanz, P. (1999) Zur Epidemiologie und zu den möglichen Ursachen von Impfdurchbrüchen in Rinderbeständen mit Trichophytie. Praktischer Tierarzt 80, 681-693.
17. Forche, A., Schönian, G., **Gräser, Y.**, Vilgalys, R. & Mitchell, T.G. (1999). Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. Fung. Gen. Biol. 28, 107-125.
18. **Gräser, Y.**, Kühnisch, J., & Presber, W. (1999). Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. J. Clin. Microbiol. 37, 3713-3717.
19. El Fari, M., **Gräser, Y.**, Presber, W. & Tietz, H.J. (2000): An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. Mycoses 43, 191-196.

20. De Hoog, G.S., Bowman, B., **Gräser, Y.**, Haase, G., El Fari, M., Gerrits Van Den Ende, A.H.G., Melzer-Kricks, B. & Untereiner, W.A. (1998) Molecular phylogeny and taxonomy of medical important fungi. *Med. Mycol.* 36, Suppl. I, 52-56.
21. Blanz, P., Buzina, W., Ginter, G. & **Gräser, Y.** (2000). Molekularbiologische Methoden und ihre Konsequenzen für Taxonomie und Diagnostik bei Dermatophyten. *Mycoses* 43, Suppl. 1, 11-16.
22. El Fari, M., Tietz, H.-J., Presber, W. & **Gräser, Y.** (1999) Development of a oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*. *Br. J. Dermatol.* 141, 240-245.

III. Verzeichnis sämtlicher Publikationen

Originalpublikationen

1. Schönian, G., **Gräser, Y.**, Starke, R., Mehl, M., Presber, W. & Hegenscheid, B. (1990) Trends in der medizinischen Mikrobiologie - Gensonden in der medizinischen Mikrobiologie. *Z. ges. Hyg.* 36, 466-470.
2. Schönian, G., Sokolowska-Köhler, W., Bollmann, R., Schubert, A., **Gräser, Y.** & Presber, W. (1992) Determination of S fimbriae among *Escherichia coli* strains from extraintestinal infections by colony hybridization and dot enzyme immunoassay. *Zbl. Bakt.* 276, 273-279.
3. **Gräser, Y.** & Schönian, G. (1992) Identification of aerobactin genes in clinical isolates of *E.coli* using a non-radioactive DNA probe. *Zbl. Bakt.* 277, 22-27.
4. Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H.J., Meyer, W., **Gräser, Y.**, Tausch, I., Presber, W., and Mitchell, T.G. (1993) Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with polymerase chain reaction. *Mycoses* 36, 171-179.
5. Schönian, G., **Gräser, Y.**, Meusel, O., Meyer, W., Buchholz, P., Presber, W. & Mitchell, T.G. (1993) Application of PCR fingerprinting to epidemiological analysis of bacterial and fungal pathogens. In: *Methods in DNA amplification*. Eds. Rolfs et al.
6. **Gräser, Y.**, Klare, I., Halle, E., Gantenberg, R., Buchholz, P., Jacobi, H.D., Presber, W. & Schönian, G. (1993) Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak using PCR fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2417-2420.
7. **Gräser, Y.**, Meyer, W., Halle, E., Presber, W. & Schönian, G. (1993) Optimization of a PCR-based assay for fingerprinting microorganisms. *Med. Microbiol. Lett.* 2, 379-385.
8. Grundmann, H.J., **Gräser, Y.**, Schönian, G. & Daschner, F.D. (1994) Randomly primed polymerase chain reaction yields comparable results to restriction fragment analysis in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Med. Microbiol. Lett.* 3, 42-48.
9. Heisig, P., Kratz, B., Halle, E., **Gräser, Y.**, Altwegg, M., Rabsch, W. & Faber, J.-P. (1995) Identification of DNA Gyrase A mutations in ciprofloxacin resistant isolates of

Salmonella typhimurium from men and cattle in Germany. Microbial Drug Resistance Mechanisms Epidemiology and Disease 1, 211-218.

10. Claros, M., Schönian, G., **Gräser, Y.**, Montag, Th., Rodloff, A.C., Citron, D.M. & Goldstein, E.J.C. (1995) Identification and strain differentiation of *Bacteroides fragilis* group species and Prevotella bivia by PCR fingerprinting. Anaerobe 1, 209-217.
11. Thanos, M., Schönian, G., Meyer, W., Schweynoch, C., **Gräser, Y.**, Mitchell, T.G., Presber, W. & Tietz, H.J. (1996) Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. J. Clin. Microbiol. 34, 615-621.
12. Schönian, G., Schweynoch, C., Zlateva, K., Oskam, L., Kroon, N., **Gräser, Y.**, & Presber, W. (1996) Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 19-29.
13. Schönian, G., Tietz, H.J., Thanos, M. & **Gräser, Y.** (1996) Anwendung molekularbiologischer Methoden für Diagnostik und Epidemiologie humaner Pilzinfektionen. Mycoses 39, 73-80.
14. **Gräser, Y.**, Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T.G. & Vilgalys, R. (1996) Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 12473-12477.
15. Schönian, G., **Gräser, Y.** & Tietz, H.J. (1997) Molekularbiologische Methoden bei der Diagnostik von Dermatomykosen. Hautspectrum 1, 3-4.
16. Vilgalys, R., **Gräser, Y.**, Schönian, G., Presber, W. & Mitchell, T.G. (1997) Response to „Are *Candida albicans* natural populations subdivided?“ Trends Microbiol. 5, 253-256.
17. **Gräser, Y.**, Tietz, H.J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G., Forche, A., Presber, W. & Schönian, G. (1997) Detection and Application of DNA Polymorphisms to Identify Species and Strains of *Candida* and to Analyze the Population Structure of *C. albicans*. Microbiol. Cult. Coll. 13, 11-20.

18. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Presber, W., Sterry, W., Presber, W. & Tietz, H.J. (1998) Identification of common Dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using PCR fingerprinting. Br. J. Dermatol. 138, 576-582.

19. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Kuipers, A.F.A. & De Hoog, G.S. (1998) Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Nederlands tijdschrift voor Medizijnische Microbiologie, April, 19-20.

20. De Hoog, G.S., Bowman, B., **Gräser, Y.**, Haase, G., El Fari, M., Gerrits Van Den Ende, A.H.G., Melzer-Kricks, B. & Untereiner, W.A. (1998) Molecular phylogeny and taxonomy of medical important fungi. Med. Mycol. 36, Suppl. I, 52-56.

21. Kielstein, P., Wolf, H., **Gräser, Y.**, Buzina, W. & Blanz, P. (1998) On the variability of *Trichophyton verrucosum* isolates from vaccinated herds with ringworm of cattle. Mycoses 41, Suppl. 2, 58-64.

22. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A.F.A., De Hoog, G.S., M., Presber, W. & Tietz, H.J. (1999) Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Med. Mycol. 37, 105-114.

23. **Gräser, Y.**, Kuipers, A.F.A., Presber, W. & De Hoog, S. (1999) Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. Med. Mycol. 37, 315-330.

24. El Fari, M., Tietz, H.J., Presber, W., Sterry, W. & **Gräser, Y.** (1999) Development of a oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*. Br. J. Dermatol. 141, 240-245.

25. Kielstein, P., Wolf, H., **Gräser, Y.**, Buzina, W. & Blanz, P. (1999) Zur Epidemiologie und zu den möglichen Ursachen von Impfdurchbrüchen in Rinderbeständen mit Trichophytie. Praktischer Tierarzt 80, 681-693.

26. **Gräser, Y.**, Kühnisch, J. & Presber, W. (1999) Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. J. Clin. Microbiol. 37, 3713-3717.

27. Forche, A., Schönian, G., **Gräser, Y.**, Vilgalys, R. & Mitchell, T.G. (1999) Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. Fung. Gen. Biol. 28, 107-125.

28. El Fari, M., **Gräser, Y.**, Presber, W. & Tietz, H.J. (2000): An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses* 43, 191-196.
29. **Gräser, Y.**, Kuijpers, A.F.A., El Fari, M., Presber, W. & De Hoog, G.S. (2000) Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. *Med. Mycol.* 38: 143-153.
30. **Gräser, Y.**, Kuijpers, A.F.A., Presber, W. & De Hoog, G.S. (2000) Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3329-3336.
31. Rainer, J., Wedde, M., De Hoog, G.S., **Gräser, Y.** & Gilges, S. (2000) Molecular variability of *Pseudoallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2802-3273.
32. Blanz, P., Buzina, W., Ginter, G. & **Gräser, Y.** (2000). Molekularbiologische Methoden und ihre Konsequenzen für Taxonomie und Diagnostik bei Dermatophyten. *Mycoses* 43, Suppl. 1, 11-16.
33. **Gräser, Y.**, De Hoog, G.S. & Kuijpers, A.F.A. (2000) Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. In: *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micología* 17 (Suppl.), p. 17-21. Eds. RKS Kushwaha & J Guarro, Bilbao, País Vasco Spain.

Übersichtspublikationen

1. Schönian, G. & **Gräser, Y.** (1990) Gensondentechnik zum Virulenzmarker-Nachweis. In: *Virulenz und Chemotherapeutika*. Upjohn GmbH, Medical Sciences Liaison
2. **Gräser, Y.** & Tietz, H.J. (2000) Erkrankungen der Haut durch Dermatophyten. In: *Infektionsbiologie – Handbuch und Atlas für Klinik und Praxis*. Ecomed Verlag, , Ed. F. Hofmann, Landsberg/Lech.

IV. Verzeichnis sämtlicher Abstrakts und Kongreßbeiträge

Abstrakts

1. Schönian, G., **Gräser, Y.**, Yanishewskii, N. & Epler, B. Klonierung der Aerobactingene von *E.coli* (Poster). Kongreß der Gesellschaft für Mikrobiologie und Epidemiologie, Rostock, 1989
2. Schönian, G. & **Gräser, Y.** Entwicklung und Anwendung von DNA-Sonden zum Aerobactin-Nachweis (Vortrag). XI. Kongreß der Gesellschaft für Mikrobiologie und Epidemiologie, Erfurt, 1990
3. **Gräser, Y.**, Schönian, G., Bollmann, R., Sokolowska-Köhler, W. & Buchholz, P. Aerobactin-Nachweis durch Koloniehybridisierung bei *E. coli*- Stämmen aus klinischen Isolaten (Poster). XI. Kongreß der Gesellschaft für Mikrobiologie und Epidemiologie, Erfurt, 1990
4. Schönian, G., Meusel, O., Meyer, W., Lieckfeldt, E., Tietz, H.J. & **Gräser, Y.** Typisierung von klinischen *Candida albicans*-Isolaten mittels AP-PCR (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Graz, 1992
5. **Gräser, Y.**, Meusel, O., Buchholz, P. & Schönian, G. Die AP-PCR - eine Methode zum Nachweis von DNA-Polymorphismen bei Bakterien und Pilzen (Poster) . 44. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Leipzig, 1992
6. Schönian, G., Bollmann, R., Sokolowska-Köhler, W., Schubert, A., **Gräser, Y.** & Presber, W. Determination of S fimbriae among *E.coli* strains from extraintestinal infections by colony hybridization and dot enzyme immunoassay (Vortrag). VAAM/DGHM Workshop on "Molecular Pathogenicity of Bacteria - Basic and Applied Aspects", Schierke, 1992
7. Meusel, O., Meyer, W., Lieckfeldt, E., Tietz, H.J., **Gräser, Y.** & Schönian, G. Typisierung von klinischen *Candida albicans*-Stämmen mittels AP-PCR (Poster). 44. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Leipzig, 1992
8. Schönian, G. & **Gräser, Y.** Application of PCR fingerprinting to epidemiological analysis of bacterial and fungal pathogens (Vortrag). 2. International Symposium on Usage of PCR and Alternative Amplification Methods in Infectious and Genetic Diseases, Berlin, 1993

9. **Gräser, Y.**, Halle, E., Klare, I., Buchholz, P., Jacobi, H. D., Presber, W. & Schönian, G.:
Epidemiologische Studie von *Acinetobacter baumannii*-Ausbrüchen mittels PCR-Fingerprinting (Vortrag). 45. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Karlsruhe, 1993

10. Schönian, G., **Gräser, Y.**, Meusel, O., Jacobi, H.D., Presber, W. & Tietz, H.J.
Charakterisierung klinischer *Candida albicans*-Stämme durch DNA-Fingerprinting mittels Polymerasekettenreaktion (Vortrag). 45. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Karlsruhe, 1993

11. Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H.J., Meyer, W., **Gräser, Y.**, Tausch, I., Mitchell, T.G. & Presber, W. Genetic fingerprinting of clinical *Candida albicans* strains by arbitrarily primed PCR (Vortrag). 6. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCM), Sevilla, 1993

12. **Gräser, Y.**, Schönian, G., Halle, E., Gantenberg, R., Klare, I. & Presber, W.
Epidemiological study by arbitrarily primed PCR of an *Acinetobacter baumannii* outbreak (Poster). 6. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCM), Sevilla, 1993

13. Heisig P., **Gräser Y.**, Halle E., Kratz B., Klare I., Presber W. & Wiedemann B.
Fluoroquinolone resistance in *S. typhimurium* (Vortrag). International Congress of Chemotherapy (ICC), Stockholm, 1993

14. Schönian G., **Gräser Y.**, Thanos M., Jacobi H., Grundmann H., Presber W. & Tietz H.J.
Typing of species and strains within the genus *Candida* by PCR fingerprinting (Vortrag). XII. Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Adelaide, 1994

15. **Gräser Y.**, Volovsek M., Morlang J., Schönian G., Mitchell T.G. & Vilgalys R.
Development of DNA markers for population genetic studies in *Candida albicans* (Vortrag). XII. Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Adelaide, 1994

16. Schönian, G. & **Gräser, Y.** Detection of DNA polymorphisms within the genus *Candida albicans* and its use for epidemiological and population genetic studies (Vortrag). International Workshop on "Molecular Pathogenesis of Fungal infections", Würzburg, Juni 1995

17. Schönian, G., **Gräser, Y.**, Thanos, M. & Tietz, H.J. Anwendung molekularbiologischer Methoden für Diagnostik und Epidemiologie humaner Pilzinfektionen (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Dresden September 1995

18. **Gräser, Y.**, Volovsek, M., Schönian, G., Presber, W. & Vilgalys, R. Klonalität und Rekombination bei *Candida albicans*. Eine populationsgenetische Analyse unter Nutzung molekularer Marker (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Dresden, September 1995

19. Forche, A., **Gräser, Y.**, Presber, W. & Schönian, G. Entwicklung genetischer Marker für populationsgenetische Untersuchungen bei *Candida albicans* (Poster). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Dresden, September 1995

20. Thanos, M., Schönian, G., Schweynoch, C., **Gräser, Y.**, Presber & W., Tietz, H.J. Schnelle Identifizierung verschiedener *Candida*-Spezies mit Hilfe des PCR-Fingerprinting (Poster). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Dresden, September 1995

21. **Gräser, Y.**, El Fari, M. & Tietz, H.J. PCR fingerprinting in Dermatophytes (Poster). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Dresden, September 1995

22. Forche, A., **Gräser, Y.**, Tietz, H.J., Presber, W. & Schönian, G. Development of molecular markers for population genetic studies in *Candida albicans* (Poster). Klinisch-Mikrobiologisch-Infektiologisches Symposium, Berlin, Dezember 1995

23. Zlateva, K., Schönian, G., Deutsch, F., **Gräser, Y.** & Presber, W. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer I and its use for identification of *Leishmania* parasites (Poster). Klinisch-Mikrobiologisch-Infektiologisches Symposium, Berlin, Dezember 1995

24. Thanos, M., Schönian, G., Schweynoch, C., **Gräser, Y.**, Presber, W. & Tietz, H.J. Rapid Identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR (Poster). Klinisch-Mikrobiologisch-Infektiologisches Symposium, Berlin, Dezember 1995

25. **Gräser, Y.**, El Fari, M. & Tietz, H.J. PCR fingerprinting in *Dermatophytes* (Poster). Klinisch-Mikrobiologisch-Infektiologisches Symposium, Berlin, Dezember 1995

26. Forche, A., **Gräser, Y.**, Tietz, H.J., Presber, W. & Schönian, G. Development of molecular markers for population genetic studies in *Candida albicans* (Poster). Meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM), Lissabon, Mai 1996

27. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Tietz, H.J. & Presber, W. Phylogeny of *Dermatophytes* using sequence analysis of the ribosomal ITS region (Vortrag). Meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM), Lissabon, Mai 1996

28. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Tietz, H.J. & Presber, W. Phylogeny of *Dermatophytes* using sequence analysis of the ribosomal ITS region (Poster). International Workshop on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Pathogenic Microorganisms, CDC, Atlanta, Juni 1996

29. **Gräser, Y.**, Tietz, H.J., Forche, A., Schönian, G., Presber, W. & Vilgalys, R. Detection of DNA Polymorphisms within the genus *Candida* and its use for strain typing and population genetic studies (Vortrag). International Congress for Culture Collections (ICCC8), Veldhoven, August 1996

30. Wolf, H., **Gräser, Y.** & Seelmann, M. Zur epidemiologischen Bewertung von *Microsporium canis*- und *Trichophyton mentagrophytes*-Isolaten bei Hund und Katze (Poster). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Kiel, September 1996

31. El Fari, M., **Gräser, Y.**, Rudolf, J., Presber, W. & Tietz, H.J. Development of a species specific oligonucleotide probe for the detection of *Trichophyton rubrum*. Posterworkshop "Methodische Entwicklungen in der mikrobiologischen Nukleinsäurediagnostik" des 6. Klinisch-Mikrobiologisch-Infektiologisches Symposiums, Berlin, Dezember 1996

32. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Presber, W. & Tietz, H.J. Phylogeny of *Dermatophytes* using sequence analysis of the ribosomal ITS region (Vortrag). 13. Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Parma, Juni 1997

33. El Fari, M., Tietz, H.J., Kuijpers, A.F.A., Presber, W. & **Gräser, Y.** Identification of common dermatophytes using PCR fingerprinting (Poster). 13. Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Parma, Juni 1997

34. Forche, A., **Gräser, Y.**, Tietz, H.J., Pauli, D., Svoboda, R. & Schönian, G. Population genetic studies in *Candida albicans* using codominant single locus markers (Poster). 13.

Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Parma,
Juni 1997

35. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Presber, W., & Tietz, H.J. Phylogeny of *Dermatophytes* using sequence analysis of the ribosomal ITS region (Vortrag). 2nd International Workshop on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Pathogenic Microorganisms. Montpellier, Mai 1997
36. **Gräser, Y.**, El Fari, M., Wolf, H., Presber, W. & Tietz, H.J. Identifizierung klinisch relevanter Dermatophyten mittels PCR Fingerprinting. Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Aachen, September 1997
37. El Fari, M., **Gräser, Y.**, Rudolf, J., Presber, W. & Tietz, H.J. Entwicklung einer spezifischen Oligonukleotidsonde für *Trichophyton rubrum* (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Aachen, September 1997
38. Gräser, Y. Identifizierung von Dermatophyten (Vortrag). 12. Tagung der AG „Mykologische Laboratoriumsdiagnostik“ der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Berlin, Oktober 1997
39. Gräser, Y., El Fari, M., Kuijpers, A.F.A. & De Hoog, S. Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrdermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region (Vortrag). Voorjaarsvergdering van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, Veldhoven, April 1998
40. **Gräser, Y.**, Kuijpers, A.F.A. & De Hoog, S. Sind Dermatophyten der Gattungen *Microsporum* und *Trichophyton* überklassifiziert? (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Frankfurt/Oder, September 1998
41. El Fari, M., Tietz, H.J., Presber, W. & **Gräser, Y.** Epidemisches Vorkommen von *Trichophyton tonsurans* in Deutschland (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Frankfurt/Oder, September 1998
42. Harmsen, D., Rothgänger, J, **Gräser, Y.**, Kuijpers, A.F.A., De Hoog, S., Albert, J. & Frosch, M. Ridom-ein WWW-basierter Service zur molekularen Identifizierung von Dermatophyten (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft Frankfurt/Oder, September 1998

43. Wolf, H., Kielstein, P. & **Gräser, Y.** Zur Variabilität von *Trichophyton (T.) verrucosum*-Isolaten aus Impfbeständen mit Rindertrichophytie (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Frankfurt/Oder, September 1998
44. **Gräser, Y.** Zur Taxonomie von Dermatophyten (Vortrag). III. Statusworkshop „Eukaryontische Krankheitserreger“. DGHM, Bonn, Januar 1999
45. **Gräser, Y.** Variability in *T. rubrum* populations (Vortrag). Voorjaarsvergadering van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, Veldhoven, April 1999
46. **Gräser, Y.** The evolutionary origin of anthropophilic dermatophytes (Vortrag). IXth Congress of the International Union of Microbial Societies (IUMS), Sydney, August 1999
47. **Gräser, Y.** Molekulare Taxonomie und Populationsgenetik von Dermatophyten (Vortrag). 2. Workshop für Mikrobielle Systematik, Populationsgenetik und Infektionsepidemiologie, VAAM- & DGHM-Fachgruppen Tagung, Berlin, November 1999
48. **Gräser, Y.** Molekulare Methoden in der Pilzsystematik (Vortrag). Jahrestagung der Deutschsprachige Mykologischen Gesellschaft, Berlin, September 2000
49. **Gräser, Y.** & Blanz, P. Molekularbiologische Methoden und ihre Konsequenzen für Taxonomie und Diagnostik der Dermatophyten (Vortrag). 2. Veterinärmedizinisch-mykologisches Symposium, Leipzig, Oktober 2000
50. **Gräser, Y.** Speciation in dermatophytes exemplified by the *Microsporum canis* complex (Vortrag). Meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM), Barcelona, November 2000
51. **Gräser, Y.** Die neue Nomenklatur der Dermatophyten. (Vortrag). Lamisil-Expertenworkshop, Dresden, Februar 2001

Kongreßbeiträge

1. Schönian, G., **Gräser, Y.**, Bollmann, R., Sokolowska-Köhler, W., Schubert, A. & Presber, W. Einsatz von DNA-Sonden und PCR-Technik zum Nachweis von Virulenzmerkmalen - Voraussetzung zum Patientenmonitoring (Vortrag). Wissenschaftliches Kolloquium, Kaiseraugst/ROCHE, 1991

2. Schönian, G., Buchholz, P., **Gräser, Y.** & Kückler, R. Konzepte zum Einsatz der PCR-Technik bei der Diagnostik von Infektionen durch Mykobakterien (Vortrag).
Wissenschaftliches Kolloquium, Kaiseraugst/ROCHE, 1991
3. **Gräser, Y.** Nachweis und Einsatz von DNA Polymorphismen zur Spezies- und Stammidentifizierung von *Candida* und zur Analyse der Populationsstruktur von *Candida albicans* (Vortrag). *Candida* Workshop, Erlangen, September 1996
4. **Gräser, Y.** DNA Variabilitäten innerhalb der Familie der *Arthrodermataceae* (Vortrag).
Statusworkshop „Eukaryontische Krankheitserreger“, Göttingen, Januar 1997
5. **Gräser, Y.**, Vilgalys, R., Forche, A. & Schönian, G. Klonalität oder Rekombination in *Candida albicans*? (Vortrag). 1. Workshop für Mikrobielle Systematik,
Populationsgenetik und Infektionsepidemiologie, VAAM-& DGHM-Fachgruppen
Tagung, Würzburg, November 1997
6. **Gräser, Y.** Taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (Vortrag). Mykologisches
seminar, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Mai 1999
7. **Gräser, Y.** Molekulare Taxonomie und Populationsgenetik bei Dermatophyten (Vortrag).
Mykologisches Seminar, Institut für Botanik der Karl-Franzens-Universität, Graz, Juni
1999
8. **Gräser, Y.** Dermatophyten-Taxonomie (Vortrag). Mykologisches Seminar, Universitäts-
Hautklinik, Würzburg, Oktober 1999
9. **Gräser, Y.** Molekulare Taxonomie der Dermatophyten (Vortrag). "Course on Medical
Mycology" des Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Würzburg, März, 2000
10. **Gräser, Y.** The evolution of the *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes*
complexes (Vortrag). 3. Workshop für Mikrobielle Systematik, Populationsgenetik und
Infektionsepidemiologie, VAAM- & DGHM-Fachgruppen Tagung, Berlin, November
2000
11. **Gräser, Y.** Neue Erkenntnisse zur Taxonomie der Dermatophyten. (Vortrag).
Arbeitsgruppen-Tagung „Klinische Mykologie“ der DmykG, Berlin, Februar 2001

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG
gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Unterschrift