

Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

**Entwicklung und Evaluierung von PCR-Methoden zum
Nachweis von *Coccidioides posadasii***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Jan Kern

aus

Tübingen

2005

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Knobloch

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Geschichte und Taxonomie	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Klinik	4
1.4	Therapie	5
1.5	Diagnostik	7
	1.5.1 Etablierte Diagnoseverfahren	7
	1.5.2 Experimentelle PCR-Verfahren	9
1.6	Ziele der Arbeit	10
2	Material und Methoden	
2.1	Material	11
2.2	DNA-Extraktion	15
2.3	Kontrolle der Infektiosität nach Extraktion	16
2.4	Amplifikation von <i>Coccidioides posadasii</i> -DNA	17
2.5	Darstellung der PCR-Produkte	20
2.6	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen	21
2.7	Positiv-, Negativ- und Leerwertkontrollen	21
2.8	Sensitivität und Spezifität	22
2.9	Sequenzierung	22
2.10	Mikrosatelliten	24
2.11	Klonierung	27
2.12	LightCycler-PCR	28
3	Ergebnisse	
3.1	Kontrolle der Infektiosität nach Extraktion	30
3.2	Nachweis von <i>Coccidioides posadasii</i> mittels PCR-Verfahren	31
3.3	Identifizierung der Spezies mittels Längenbestimmung zweier Mikrosatelliten	35
3.4	Diagnostische PCR	39
4	Diskussion	
4.1	Extraktion	40
4.2	Nested-PCR und LightCycler PCR	42
4.3	Mikrosatelliten	46
4.4	Fazit	48

5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	51
	Legende	58
	Danksagungen	60
	Lebenslauf	61

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Taxonomie

Im Jahre 1892 wurde die Kokzidioidomykose erstmals von dem argentinischen Arzt Posadas in Buenos Aires beschrieben. Er untersuchte einen Soldaten mit merkwürdigen, seit vier Jahren bestehenden und bis dahin als Mycosis fungoides beschriebenen Hautveränderungen. Ihm gelang die Isolierung von „eigenthümlichen Körper[n], die er, meiner Ansicht nach mit Recht, als Sporozoen klassifizierte und mit der vorliegenden Krankheit in ursächlichem Zusammenhange betrachtete“ (Wernicke, 1892). Der Krankheitserreger wurde den Protozoen zugerechnet und folglich als „Kokzidien-artig“ (*Coccidioides*) bezeichnet, die durch ihn hervorgerufene Krankheit verläuft „nicht milde“ (lat. *immitis*). Acht Jahre später konnte in Kalifornien nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Erreger um einen Pilz handelt.

Tab.1: Systematische Einordnung von *Coccidioides immitis* (Quelle: National Center for Biotechnology Information (NCBI), Washington DC, USA)

Rangordnung	Bezeichnung
Reich	<i>Myceteae</i>
Abteilung	<i>Ascomycota</i>
Unterabteilung	<i>Pezizomycotina</i>
Klasse	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordnung	<i>Onygenales</i>
Familie	Onygenaceae
Gattung	<i>Coccidioides</i>
Art	<i>immitis ; posadasii</i>

1.2 Epidemiologie

Die Kokzidioidomykose wird durch *Coccidioides immitis*, einen dimorphen Pilz, verursacht. Sie kommt in Wüsten und Halbwüsten ausschließlich auf dem amerikanischen Kontinent vor. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich vom Südwesten der USA über Mittelamerika, insbesondere Mexiko, bis nach Südamerika, wo vor allem Venezuela, Brasilien und Argentinien zu nennen sind (Pappagianis, 1988). Die höchste Inzidenz der Kokzidioidomykose findet sich in Kern County, San Joaquin Valley, Kalifornien; in Südarizona; im südlichen New Mexiko; Nordtexas und in allen nördlichen Bundesstaaten Mexikos. Die Inzidenz der Kokzidioidomykose in den USA wird auf 100 000 Fälle geschätzt (Stevens, 1995; Chiller et al. 2003) und sie variiert jahreszeitlich: im Spätsommer und zu Herbstbeginn, wenn der Boden trocken und die Arthrokonidien entstanden sind, ist die Inzidenz am höchsten. Wenn es zu dieser Jahreszeit regnet (was untypisch in Südkalifornien ist), nimmt sowohl die Menge des Wüstenstaubes, als auch die Zahl der Erkrankungen ab (Kirkland et al., 1996). Allerdings wurde beobachtet, etwa in den Jahren 1991-1993, in denen die Zahl der Erkrankungsfälle bis auf das zehnfache anstieg (CDC, 1993), dass die Inzidenz der Kokzidioidomykose in Sommern, die auf regenreiche Winter folgten, höher war, als nach trockenen Wintern. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in heißen Sommern die Zahl der mit *C. immitis* konkurrierenden Organismen abnimmt. *C. immitis* wächst dann zwar nicht, aber der Pilz überlebt als infektiöse Dauerform. Nach starken Regenfällen keimen die Arthrokonidien und die Pilze vermehren sich besonders stark aufgrund mangelnder konkurrierender Organismen (Jianadu , 1995).

Nach Wüstenstürmen folgt häufig ein Ausbruch der Kokzidioidomykose. Ein besonders starker Wüstensturm, der sich 1977 ereignete, trug Staub aus dem San Joaquin Valley über hundert Kilometer bis in die San Francisco Bay Area: hunderte Fälle von Kokzidioidomykose in diesem Nicht-Endemiegebiet waren die Folge

(Pappagianis et al., 1978). Nach einem Erdbeben mit dem Epizentrum in Northridge, Kalifornien, wurden 170 akute Kokzidioidomykosen in Ventura County, CA nachgewiesen, eine Region, mit normalerweise niedriger Inzidenz dieser Erkrankung (CDC, 1994).

Aufgrund von Längenpolymorphismen Mikrosatelliten-haltiger Genabschnitte werden innerhalb der Gattung *Coccidioides* zwei Spezies unterschieden: *C. immitis* und *C. posadasii* (Fisher et al., 2002).

Der Pilz wächst in der saprobischen Phase als Myzel, in Form von Hyphen, im Erdboden bis zu einer Tiefe von 30 cm. Nach Niederschlägen wächst das Myzel bis zur Erdoberfläche. Wenn dieses trocknet, geht jede zweite Zelle der Hyphen durch Autolyse zugrunde. Die verbleibenden Zellen entwickeln sich zu tonnenförmige Arthrokonidien (Gliedersporen), die umweltresistent und infektiös sind. Dies wird als enteroartrische Entwicklung bezeichnet. *Coccidioides immitis* ist die einzige bekannte Spezies innerhalb der primär pathogenen Pilze, die diese Konidienentwicklung aufweist (Kirkland et al., 1996). Bei Trockenheit verlieren die reifen Hyphen ihre Integrität, das Myzel zerfällt in Arthrokonidien, welche mit dem Wind in die Luft gelangen. Diese wachsen wieder als Hyphen, wenn sie zurück in den Boden gelangen. Werden sie, von Menschen oder anderen Säugetieren, inhaliert, bildet sich, unter den veränderten Temperaturbedingungen, die sogenannte parasitische Phase aus. In der Lunge des Wirtes vergrößern sich die Arthrokonidien und entwickeln sich zu dickwandigen Sphärulen. In dieser zwischen 30 und 60 µm großen Sphärule entwickeln sich bis zu 600 Endosporen, die nach Aufbrechen der Sphärule freigesetzt werden. Aus jeder Endospore kann sich eine neue Sphärule bilden, was zu einer exponentiellen Vermehrung führt. Wenn infiziertes Material, z.B. der Kadaver eines kranken Tieres, wieder in den Erdboden gelangt oder Sputum, Eiter oder Gewebebiopsien auf Kulturböden gegeben werden, bildet sich bei Raumtemperatur wieder ein Myzel aus, so dass sich der Lebenszyklus schließt. Eine Transmission von Mensch zu Mensch ist nicht möglich, da ausschließlich die Arthrokonidien infektiös sind, die im Wirt typischerweise nicht gebildet werden. Deshalb ist die Kokzidioidomykose eine infektiöse, aber keine kontagiöse Erkrankung. Die einzige Übertragung von Mensch zu Mensch war

indirekt durch Exposition mit kontaminierten Sekreten. Wenn z.B. infizierter Eiter in Kleidung eindringt, so können ausreichende Umgebungsbedingungen vorherrschen, die es dem Pilz ermöglichen seinen Lebenszyklus zu vervollständigen und von der Gewebsform in die infektiöse Arthrokonidienform überzugehen. Patienten mit Kokzidioidomykose erfordern keine Isolierung, wohl aber eine aufmerksame Entsorgung von Materialien, welche mit Sekreten kontaminiert wurden (Stevens, 1995).

1.3 Klinik

Akute Infektion Sechzig Prozent aller mit *C. immitis* infizierten Patienten haben keine klinischen Symptome oder leichte einer selbstlimitierenden Atemwegserkrankung (Smith et al. 1946; Galgiani, 1997).

Bei anderen entwickeln sich Symptome ein bis drei Wochen nach Exposition. Typische Manifestationen ist eine Infektion des unteren Respirationstraktes, begleitet von Symptomen wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Schwäche, Gelenkschmerzen, Husten, Auswurf und Brustschmerzen. Erythema nodosum oder Erythema multiforme können sich entwickeln (Galgiani, 1999; Arsura et al., 1998). Mit bildgebenden Verfahren können eventuell zu diesem Zeitpunkt Infiltrate, Pleuraergüsse und hiläre Lymphadenopathien nachgewiesen werden. Dennoch heilt die akute Erkrankung für gewöhnlich ohne spezifische Therapie aus, auch wenn sie einige Wochen andauern kann (Stevens 1995).

In etwa einem von 200 Fällen manifestiert sich die Erkrankung extrapulmonal: typische Lokalisationen sind Haut, Knochen und Meningen. Eine miliare Disseminierung ist selten, jedoch unbehandelt mit einer hohen Letalität verbunden. Extrapulmonale Erkrankungen manifestieren sich meist innerhalb eines Jahres nach der Primärinfektion; jedoch sind spätere Erkrankungen bekannt, wenn die Immunität beeinträchtigt ist, z.B. durch eine maligne Erkrankung, HIV-Infektion oder eine immunsuppressive Therapie (Stevens, 1995). Risikofaktoren für eine disseminierende Erkrankung sind: männliches Geschlecht, Schwangerschaft (besonders wenn die Primärinfektion in der

Spätphase der Schwangerschaft auftritt), nicht weiße Hautfarbe (insbesondere philippinische Abstammung) und Immundefizienz (Galgiani, 1997; Pappagianis, 1988). Das Auftreten einer extrapulmonalen Kokzidioidomykose ist eine AIDS-definierende Erkrankung, wenn sie bei einem Patienten mit nachgewiesener Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) auftritt (CDC, 1993).

Chronische Infektion Patienten mit Diabetes oder beeinträchtigtem Immunsystem sind besonders gefährdet eine chronisch pulmonale Erkrankung auszubilden. In diesem Rahmen treten Lungenkavernen, Empyeme und bronchopleurale Fisteln auf, die schwer therapierbar sind. Bei disseminierter Erkrankung sind häufig Knochen des Schädels, der Hände, Füße, der Wirbelsäule und die Tibia mitbetroffen (Deresinski, 1980). Eine Gelenkbeteiligung, auch unifokal, ist häufig. Der Befall der Haut zeigt eine große Formenbreite, zumeist werden warzenartige Knötchen beobachtet.

Im Falle einer Meningitis sind gewöhnlich die basilaren Hirnhäute befallen. Patienten berichten häufig nur von anhaltenden Kopfschmerzen, während andere Zeichen einer meningealen Reizung meist fehlen. Im Liquor findet sich eine mononukleare Pleozytose und häufig eine Eosinophilie bei erniedrigter Glukose- und erhöhter Proteinkonzentration. Eine frühe Diagnose und Therapie der Meningitis ist dringend erforderlich, da unbehandelt 90 Prozent dieser Patienten innerhalb eines Jahres versterben (Einstein, 1961).

1.4 Therapie

Wie das Spektrum der Erkrankung, so variiert auch das Spektrum der Therapieoptionen und –erfordernisse. Die meisten Patienten mit Kokzidioidomykose genesen ohne Therapie. Patienten mit einer progressiven pulmonalen oder disseminierenden Erkrankung bedürfen einer verlängerten, möglicherweise lebenslangen Therapie. Dies gilt insbesondere für immungeschwächte Patienten, selbst nach Jahren kann es noch zur Krankheitsreaktivierung kommen (Singh et al., 1996; Blair et al., 2001). Exakte Therapiepläne sind abhängig vom jeweiligen Krankheitsbild und müssen

individuell angepasst werden. Spezifische Antimykotika zur Therapie der Kokzidioidomykose sind Amphotericin B (0,5-0,7 mg/kg/d i.v.), Ketokonazol (400 mg/d p.o.), Fluconazol (400-800 mg/d p.o. oder iv.) und Itraconazol (200 mg b.i.d. p.o.; Galgiani et al., 2000). Die Krankheitsaktivität wird u. a. anhand von Antikörpern in der Komplementbindungsreaktion bestimmt. Bei fehlendem Nachweis spezifischer Antikörper kann die Therapie beendet werden. Jedoch ist in Abhängigkeit von Krankheitsbild bei bis zu 70% mit Rezidiven innerhalb eines Jahres zu rechnen.

Die natürliche Infektion mit *C. immitis* ruft eine lebenslange, zellulär vermittelte Immunität hervor. Die Möglichkeit einer aktiven Immunisierung wäre gesundheitspolitisch sinnvoll und kosteneffektiv (Barnato et al., 2001). Daher wurden Versuche zur Entwicklung eines Impfstoffes unternommen. Im Tierversuch konnte zwar unter Verwendung von abgetöteten Sphärulen als Impfstoff eine Immunität bei den Versuchstieren erreicht werden, beim Menschen musste aber die Dosis deutlich reduziert werden aufgrund von Unverträglichkeitsreaktionen. Die mit dieser reduzierten Dosis durchgeführte Impfstudie konnte keinen eindeutigen protektiven Effekt belegen (Pappagianis et al., 1993). Das „antigen 2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA), ein spezifisches Protein der Sphärulenzellwand, gegen das beim Menschen nach überwundenen Infektion Antikörper gebildet werden, wurde ebenfalls als Vakzine in Impfstudien einsetzen. Diese waren allerdings, ebenso wie andere Versuche mit Sphärulenzellwandproteinen, bislang nur im Tiermodell erfolgreich (Kirkland et al., 1998; Delgado et al., 2003).

1.5 Diagnostik

1.5.1 Etablierte Diagnoseverfahren

Direkter Nachweis durch Färbung

Im Biopsiematerial oder anderem klinischen Untersuchungsmaterial (z.B. Eiter, Sputum, Bronchialsekret) lassen sich nach klassischen Pilzfärbungen (z.B. Giemsa-, PAS-, Wright- und Silberfärbung nach Grocott) oder Färbungen mit Bleichern (Fluoreszenzfarbstoffe wie Fungiqua A oder Uvitex 2b) die typischen Sphärulen mit Endosporen darstellen. Der Nachweis von Sphärulen bei entsprechender Klinik ist hochgradig verdächtig auf eine Kokzidioidomykose, allerdings gelingt der Nachweis nur bei entsprechend hoher Erregerlast. Werden dagegen in der mikroskopischen Untersuchung nur Endosporen gesehen, so kann dies zu Verwechslungen mit Elementen oder Zellen anderer Pilze führen (Kaufmann et al., 1998).

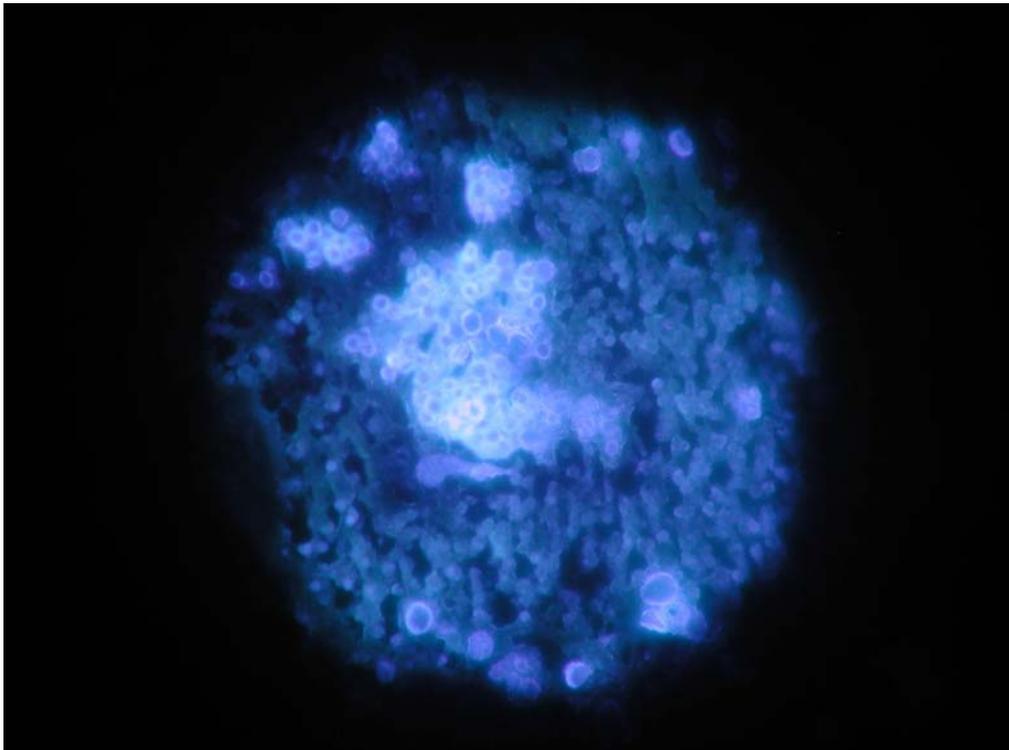


Abb.1: Aus einer Spärule freigesetzte Endosporen in Plazentagewebe mit Ausbildung neuer Sphärulen, die durch eine dickwandige Membran gekennzeichnet sind, Originalvergrößerung 1250fach, Färbung mit Fungiqua A, Fluoreszenzmikroskop: Exzitation 365 nm, Emission 405 nm

Kultureller Nachweis

Die beiden Hauptpfeiler der Labordiagnostik bilden Kultur und immunologische Testverfahren. Die Anzucht von *C. immitis* gelingt leicht, der Pilz stellt keine besonderen Anforderungen an die Wachstumsbedingungen: er wächst auf fast allen Nährmedien bei 30 °C. Kolonien bilden sich nach drei bis vier Tagen. Aufgrund der hohen Infektiosität der reifen Pilzkulturen ist eine Anzucht aber ausschließlich in Laboratorien mit Schutzmaßnahmen der Sicherheitsstufe III nach Biostoffverordnung (1999) erlaubt. Eine eindeutige mikroskopische Identifizierung der Pilze in ihrer saprobischen Phase ist nicht möglich. Weitere diagnostische Verfahren sind nötig, etwa der temperaturabhängige Wechsel der Wuchsform von *C. immitis* von der Myzelienform in die parasitäre Form im Tierversuch oder der Nachweis von extrazellulärem Coccidioidin, welches von dem wachsendem Pilz in Kultur produziert wird. Es besteht auch die Möglichkeit der DNA-Extraktion aus der Kultur und anschließender Hybridisierung mit einer kommerziellen DNA-Sonde (Stockmann et al., 1993).

Immunologische Verfahren

Ziele der Immundiagnostik sind Nachweis von *C. immitis*-spezifischen Antikörpern oder Antigenen. Hauptfokus ist Coccidioidin, ein Antigen der Myzelienphase. Neuere Verfahren weisen Antikörper gegen ein 33-kDa-Shärulen-Antigen nach. Serum IgM Antikörper können vorübergehend in 75 Prozent aller Primärinfektionen nachgewiesen werden. Der IgG-Titer steigt später an und ist meist einige Monate nach Ausheilung der Erkrankung nicht mehr nachweisbar. Kommerzielle Kits, basierend auf Komplementbindungsreaktion, Immundiffusion oder ELISA sind erhältlich. Falsch positive serologische Testergebnisse sind selten. Der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper ist immer ein Hinweis auf eine disseminierte extrapulmonale Erkrankung. Patienten mit meningealer Kokzidioidomykose haben aber häufig keine nachweisbaren spezifischen Antikörper im Serum. Auch wenn die Ergebnisse eines positiven Antikörpernachweises als hochspezifisch betrachtet werden können, ist die Sensitivität dieser Verfahren durch viele falsch negative

Ergebnisse, gering, insbesondere in der frühen Phase der Erkrankung (Wieden et al., 1996).

Ein Sphärulin-Hauttest hat nur eine eingeschränkte diagnostische Aussagekraft, da er den Durchseuchungsgrad der Bevölkerung widerspiegelt, aber keine akute Erkrankung anzeigt .

1.5.2 Experimentelle PCR-Verfahren

In den vergangenen Jahren gelang die Etablierung von PCR-Verfahren zum Nachweis erregerspezifischer DNA in der mikrobiologischen Diagnostik. Ein für den klinischen Einsatz ausgereiftes PCR-Verfahren zum Nachweis von *Coccidioides spp.* im klinischen Untersuchungsmaterial wurde bislang nicht publiziert. Möglicherweise können mit der Methode der Polymerasekettenreaktion die Untersuchungsdauer deutlich verkürzt, die Sensitivität erhöht und die Rate unspezifischer Kreuzreaktionen minimiert werden.

Bei der Wahl der Zielregion in Genen, die für ein spezifisches Protein kodieren, kann die Spezifität gesteigert werden bei gleichbleibender Sensitivität. Dies wurde für andere Systemmykosen, verursacht durch *Paracoccidioides brasiliensis* (Bialek et al., 2000) und *Histoplasma capsulatum* (Bialek et al., 2002a), bereits gezeigt.

1.6 Ziele der Arbeit

- Entwicklung und Evaluierung einer sicheren, infektions- und risikoarmen Methode zur Extraktion von *Coccidioides*-DNA basierend auf einem kommerziellen DNA-Extraktions-Kit

- Entwicklung von PCR-Verfahren auf einem konventionellen Block-Cycler und einem LightCycler mit einem *Coccidioides*-spezifischen Gen als Zielsequenz:
 - a) zur Identifizierung von in Laboratorien kultivierten Stämmen
 - b) zum Nachweis von spezifischer DNA in klinischen Untersuchungsmaterialien

- Identifizierung der *Coccidioides*-Spezies durch Längenbestimmung von zwei Mikrosatelliten, vergleichend mit zwei verschiedenen Verfahren

2 Material und Methoden

2.1 Material

Kommerziell erhältliche Kits

Perkin Elmer AmpliTaq [®] DNA-Kit	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
QIAamp [®] Tissue Kit 250	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit 250	Qiagen, Hilden
ABI PRISM [®] Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Centri-Sep [®] Spin Columns	Princeton Separations Inc., Adelphia, USA
LabChip [®] DNA 1000 Assay	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
pCR [®] 2.1-TOPO [®] Cloning Vektor	Invitrogen, Groningen, Niederlande
TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
10x LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes mix	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA

Enzyme und Chemikalien

Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia Mini-Plastico	Braun, Melsungen
Blue Dextran	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Bromphenolblau (BPB)	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleosid-Triphosphat Set (100 mM each dNTP)	Promega, Madison, WI., USA
DNA Molekulargewichtsmarker VIII 100bp DNA-Leiter, äquimolar	Boehringer, Mannheim
Ethylen-Diamin-Essigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Hybridization Probe Oligonukleotide	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	TIB Molbiol, Berlin
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide, Sequenzierstandard	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe

Proteinase K
Tris-(hydroxymethyl)amoniomethan

Roth, Karlsruhe
Sigma, Deisenhofen

Puffer-Rezepturen

5x Bromphenolblaupuffer:

50mM	Tris, pH 7,6
50 mM	EDTA
0,5%	SDS
0,1%	Bromphenolblau
18,0%	Ficoll 400 ad Aqua

5x Dextranpuffer:

10 mM	EDTA
0,4%	Blue Dextran
40,0%	Glycerin ad Aqua

50x TAE-Puffer:

2,0M	Tris, pH 8,0
1,0M	Eisessig
0.5m	EDTA ad Aqua

Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer

Agilent Technologies,
Palo Alto, CA, USA

Roche LightCycler

Roche Molecular Systems
Branchburg, NJ, USA

Sequenziergerät:
ABI Genetic Analyzer 3100

Applied Biosystems
Perkin Elmer,
Foster City, USA

ABI 373 DNA Sequencer

Applied Biosystems
Perkin Elmer,
Foster City, USA

Primus 96 plus Thermocycler

MWG Biotech, Ebersberg

Zentrifugen:

Biofuge 13
Vacuum Concentrator

Heraeus Sepatech, Hanau
Bachofer, Reutlingen

Gefäße: Reaktionsgefäßklemmständer aus
Edelstahl (Ø 80 mm, für 16
Reaktionsgefäße), in Eigenbau;
Stiel 50cm lang

Material und Methoden

Heizplatte/Magnetrührer:	Ikamaq [®] RH	IKA Works, Wilmington, USA
Gelkammern:	Jeweils 2 x 10 Taschen MWG Biotech Peqlab Sratagene	MWG Biotech, Ebersberg Peqlab, Erlangen Stratagene, Cedar Creek, TX, USA
Kamera:	Polaroid Direct Screen Instand Camera DS B4 mit Electrophoresis Hood EPH-6 Polaroid Pos/neg Instand Pack Film 665 ISO 80/20°	Polaroid, Offenbach
Schüttler:	Eppendorf Thermomixer 5436 MS Minishaker IKA [®]	Eppendorf, Hamburg IKA Works, Wilmington, USA
Microtom		R. Jung, Heidelberg
Mettler	PM 4000 Waage	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Pipetten:	Carl Roth Pipetten Eppendorf Pipette Gilson Pipetten	Roth, Karlsruhe Eppendorf, Hamburg Abimed, Langenfeld

Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen:	Biozyme budgetline [®] SafeSeal-Tips	Biozyme, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße:	Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml Reaktionsgefäße 0,5 ml	Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Numbrecht

Mikroorganismen und Untersuchungsmaterial

Einhundertzwanzig Isolate von *Coccidioides posadasii* wurden in dieser Studie verwendet. Die Kulturen wurden aus Untersuchungsmaterialien angezüchtet, die zur Routinediagnostik ins mykologische Labor der Universität von Monterrey, Nuevo Leon, Mexiko, eingesandt wurden. Die Isolate wurden von 114 verschiedenen Patienten aus Lymphknoten-, Knochen-, Lungen- und Hautbiopsien, Bronchiallavageflüssigkeiten, Liquor, Peritoneal- und Pleuraflüssigkeiten und aus Abszessen zwischen Oktober 1991 und Januar 2002 kultiviert. Sie wurden in sterilem Wasser bei Raumtemperatur gelagert und zur Extraktion für 2-3 Wochen auf Sabouraud-Glukose-Agar bei 30°C angezüchtet. Unter Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe III nach Biostoffverordnung (1999) wurde steriles Wasser den Kulturen zugegeben und Hyphen sowie Arthrokonidien von der Kultur mit einem sterilen Holzstab abgeschabt, um sie zu suspendieren. Die Pilzsuspensionen wurden den Kulturgefäßen entnommen, in sterile Eppendorfgefäße gefüllt und jeweils 2 x 200 µl dann zur Extraktion von DNA verwendet. Alle Kulturen wurden anhand mykologischer Methoden, wie Koloniemorphologie, Wachstum bei Raumtemperatur und 37°C, sowie durch mikroskopischen Nachweis von Arthrokonidien mit typischer Myzelform als *Coccidioides spp* identifiziert.

Um mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Pilzen anzuzeigen und die Spezifität der PCR zu testen, wurde extrahierte DNA von Laborstämmen eng verwandter Mitglieder der Familie *Onygenaceae* in die PCR eingesetzt. Getestet wurden: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*. Die extrahierte DNA dieser drei Spezies wurde bei -20°C gelagert und stammt aus vorangegangenen Studien des Instituts für Tropenmedizin Tübingen. Um mögliche Kreuzreaktionen mit *Candida spp.* auszuschließen, wurde extrahierte DNA von *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. dubliensis* in die PCR eingesetzt. Die *Candida*-Kulturen stammen aus dem mykologischen Labor der Universität Monterrey. Ebenfalls zur Evaluierung der PCR getestet wurden im mykologischen Labor der Universität Monterrey

gezüchtete Stämme von *Malbranchea spp.*, *Auxarthron spp.*, sowie *Chrysosporium parvum*. Die DNA wurde dem beschriebenen Protokoll entsprechend extrahiert.

Drei in Paraffin eingebettete Gewebeproben, welche histologisch als infiziert mit *Coccidioides spp* identifiziert wurden, wurden zur Evaluierung der PCR in der klinischen Diagnostik benutzt. Um die Spezifität zu testen wurden zwanzig formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Organbiopsate, die mittels Mikroskopie und PCR positiv für *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* oder *Blastomyces dermatitidis* waren, untersucht.

2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde in Monterrey, Mexiko, durchgeführt. Die Grundlage der Extraktion bildete der QIAamp[®]Tissue Kit. Das Extraktionsprotokoll des Herstellers wurde zur Zerstörung von Pilzzellwänden modifiziert. In einem autoklavierten 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 200 µl der Suspension mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 1mg/ml) über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Ergänzend zum Herstellerprotokoll wurde durch alternierendes Erhitzen und Einfrieren die Zellwand zerstört. Zunächst wurde das Reaktionsgefäß in einen Reaktionsgefäßklemmständer eingespannt und die Suspension im Wasserbad für fünf Minuten bei 100°C gekocht. Anschließend wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff für 60 Sekunden schockgefroren. Danach wurde das Reaktionsgefäß im Wasserbad rasch aufgetaut und erneut für zwei Minuten bei 100°C erhitzt. Nach abwechselndem Erhitzen und Einfrieren, in insgesamt drei Zyklen, wurde abschließend für fünf Minuten erhitzt. Auf Raumtemperatur abgekühlt, wurde, dem Protokoll entsprechend, nach Zufügen von 200 µl AL-Puffer, das Reaktionsgefäß für zehn Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Gemisch auf eine Qiagen-Extraktionssäule pipettiert. Diese besteht im Wesentlichen aus Silikat, um die DNA zu binden. Bei 9000 rpm wurde die Extraktionssäule und das dazugehörige 2 ml Auffanggefäß für eine Minute zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde gewechselt und das

abzentrifugierte Eluat verworfen. Um eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen, wurden 500 µl Waschpuffer AW 1 auf die Säule pipettiert, für eine Minute bei 9000 rpm zentrifugiert und das Auffanggefäß gewechselt. Dieser Schritt wurde mit 500 µl Waschpuffer AW2 wiederholt, allerdings wurde für drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Extraktionssäule wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 75 µl AE-Puffer von der Membran gelöst und bei 9000 rpm für eine Minute eluiert. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde dieser Extraktionsschritt wiederholt. Die Extraktion der DNA aus Paraffinblöcken war identisch, allerdings wurde das Gewebe zunächst entparaffiniert durch Zugabe von Xylol. Zur Entfernung des Xylols, das die PCR inhibieren kann, wurde 96-100 % Ethanol zugegeben. Zunächst wurden am Mikrotom jeweils 5 µm dicke Schnitte erstellt und zwei dieser Paraffinschnitte wurden zusammen mit 500 µl Xylol in ein Eppendorfgefäß gebracht. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gefäß bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Die Xylolzugabe und die nachfolgenden Schritte wurden wiederholt. Anschließend wurden 500 µl Ethanol beigegeben. Die Suspension wurde 5 Minuten inkubiert, zentrifugiert und der Überstand wurde abpipetiert. Nach erneuter Ethanolzugabe wurden die nachfolgenden Schritte wiederholt. Die Suspension wurde danach für etwa 30 Minuten in der Speed-Vac-Vakuumzentrifuge getrocknet, d.h. das Ethanol entfernt. Das weitere Extraktionsprotokoll entspricht dem oben Beschriebenen (Bialek et al., 2002a).

2.3 Kontrolle der Infektiosität nach Extraktion

Um die Sicherheit der DNA-Extraktionsmethode in Hinblick auf Reduktion der Infektiosität der Pilzsuspension zu untersuchen, wurden zehn *Coccidioides posadasii*-Stämme zufällig ausgewählt. Jeder Schritt der Extraktion wurde kontrolliert. Neun Proben × 200 µl von jedem Stamm wurden angelegt. Eine Probe jeden Stammes wurde auf Sabouraud-Glukose-Agar ohne weitere Behandlung als Wachstumskontrolle aufgebracht. Eine Probe jedes Stammes wurde nach Zufügen von 180 µl ATL-Puffer, nach Zufügen von ATL-Puffer und Proteinase K (1 mg/ml Endkonzentration), nach Zufügen von ATL-Puffer und

Proteinase K, gefolgt von 3 h Inkubation bei 56°C im Wasserbad, nach Zufügen von ATL-Puffer und Proteinase K, gefolgt von Inkubation über Nacht bei 56°C, nach alleiniger Inkubation bei 56°C über Nacht, nach Inkubation über Nacht bei 56°C, gefolgt von drei Zyklen Einfrieren und Kochen, nach Zufügen von ATL-Puffer und Proteinase K und Inkubation über Nacht bei 56°C, gefolgt von drei Zyklen Einfrieren und Kochen, nach drei Zyklen Einfrieren und Kochen, auf Sabouraud-Glukose-Agar bei 30°C kultiviert. Die angelegten Kulturen wurden alle drei Tage auf potentiell Wachstum für insgesamt 4 Wochen kontrolliert.

2.4 Amplifikation von *Coccidioides posadasii*- DNA

Primer-Design: Für den Nachweis von *Coccidioides posadasii* wurde eine Region des Gens gewählt, welches für das pilzspezifische, immundominante Zellwandprotein „antigen 2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA) kodiert. Dies ist auch als „cell wall immunoreactive protein“ bekannt (accession number in GenBank: AF013256). Diese Gensequenz ist bislang nur für *Coccidioides posadasii*, respektive *C. immitis*, beschrieben. Die Primersequenzen wurde auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen durch das BLAST-Suchprogramm (NCBI) überprüft. Die Untersuchung zeigte keine Homologien mit Gensequenzen anderer Organismen. Es waren daher keine Kreuzreaktionen zu erwarten.

Cocci I: 5'-GTA CTA TTA GGG AGG ATA ATC GTT -3'
(24 Basen, Tm: 66°C)

Cocci II: 5'-GGT GTC AAC TGG TGG GAT GTC AAT-3'
(24 Basen, Tm: 72°C)

Cocci III: 5'-ATC CCA CCT TGC GCT GTA TGT TCG A-3'
(25 Basen, Tm: 76°C)

Cocci IV: 5'-GGA GAC GGC TGG ATT TTT TAA CAT G-3'
(25 Basen, Tm: 72°C)

Das erste Primerpaar ist komplementär zu den Positionen 841 bis 864 und 1366 bis 1343, so dass ein 526 bp langes Fragment amplifiziert wird. Die

inneren Primer sind den Positionen 962 bis 986 und 1303 bis 1279 komplementär, so dass ein 342 bp langes Fragment amplifiziert wird.

Reaktionsbedingungen der PCR: Für die PCR wurde der AmpliTaq[®] DNA-Kit (Perkin Elmer) eingesetzt. Der Reaktionsmix der ersten PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, bestehend aus 10 µl DNA-Extrakt und 40 µl Reaktionsmix, hatte eine Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, und 2,5 mM MgCl₂ (10x Perkin-Elmer Puffer II plus MgCl₂ Lösung), 1 µM jedes Primers (Cocci I/II), 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100 µM jedes Desoxyribonukleosidtriphosphats.

Die PCR wurde, wie alle weiteren hier beschriebenen auch, auf einem MWG-Biotech Primus 96 plus Thermocycler durchgeführt. Das PCR-Programm der ersten PCR begann mit einer fünfminütigen Denaturierung bei 94°C, zur Einzelstrangbildung der DNA. Anschließend folgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Primeranlagerung (Annealing) bei 50°C für 30 Sekunden und der DNA-Synthese (Elongation) bei 72°C für 60 Sekunden. Abschließend wurde zur finalen Extension bei 72°C für 5 Minuten erhitzt. Danach kühlte der Thermocycler auf 4°C.

***Coccidioides posadasii*- PCR**

Tab.2: Pipettierschema, Endkonzentration der Reagenzien und Temperaturprofil der *Coccidioides posadasii*- PCR

Reagenzien	Menge	Endkonzentration	Temperaturprofil
H ₂ O _{bide} st.	28,2 µl		Denaturierung 5 Min. 94°C
10x Puffer (pH 8,3)	5,0 µl	10 mM Tris-HCL 50 mM KCL	Zyklenzahl 35
MgCl ₂ -Lsg.	5,0 µl	2,5 mM	Denaturierung 30 Sek. 94°C
Primer Cocci I	0,5 µl	1,0 µM	Annealing 30 Sek. 50°C
Primer Cocci II	0,5 µl	1,0 µM	Elongation 60 Sek. 72°C
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM	
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U	Extension 5 Min. 72°C
Reaktionsmix	40,0 µl		
DNA-Extrakt	10,0 µl		
Gesamtvolumen	50,0 µl		

Auch für die nested PCR wurde der AmpliTaq[®] DNA-Kit verwendet. Dem Reaktionsansatz der nested PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde 1 µl des Reaktionsprodukts der ersten PCR zugegeben. Der Reaktionsmix hatte eine Endkonzentration von 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCl, und 2,5 mM MgCl₂, 1 µM jedes Primers (Cocci III/IV), 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100 µM jedes der vier Desoxyribonukleosid-Triphosphate. Beginnend mit einer fünfminütigen Denaturierung bei 94°C, folgten 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Primeranlagerung bei 60°C für 30 Sekunden und DNA-Synthese bei 72°C für 60 Sekunden. Abschließend wurde bei 72°C für 5 Minuten erhitzt. Danach kühlte der Cyclyer auf 4°C.

***C. posadasii* nested PCR**

Tab.3: Pipettierschema, Endkonzentration der Reagenzien und Temperaturprofil der *Coccidioides posadasii* nested PCR

Reagenzien	Menge	Endkonzentration	Temperaturprofil
H ₂ O _{bidest.}	37,2 µl		Denaturierung 5 Min. 94°C
10x Puffer (pH 8,3)	5,0 µl	10 mM Tris-HCL 50 mM KCL	Zyklenzahl 30
MgCl ₂ -Lsg.	5,0 µl	2,5 mM	Denaturierung 30 Sek. 94°C
Primer Cocci III	0,5 µl	1,0 µM	Annealing 30 Sek. 60°C
Primer Cocci VI	0,5 µl	1,0 µM	Elongation 60 Sek. 72°C
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM	
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U	Extension 5 Min. 72°C
Reaktionsmix	49,0 µl		
Amplifikat 1.PCR	1,0 µl		
Gesamtvolumen	50,0 µl		

2.5 Darstellung der PCR-Produkte

Die Amplifikate wurden auf einem 1,75%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wurden in einen 500 ml-Erlenmeyerkolben 0,7 g Agarose und 40 ml TAE-Puffer gegeben. In der Mikrowelle wurde das Gemisch bei 1000 W erhitzt, mehrmals zum Kochen gebracht und wieder kurz abgekühlt, um eine ausreichende Durchmischung zu erzielen. Nach etwa zwei Minuten war die Agarose vollständig gelöst. Nach Abkühlen wurden der viskösen Masse 2 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml) zugefügt, durch Schwenken vermischt und in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Die Gele wurden etwa für zwei Stunden lichtgeschützt

ausgehärtet. Anschließend wurden die Käbme entfernt und die Gelkammern mit 1xTAE-Puffer aufgefüllt.

In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 2 µl Ladepuffer mit 10 µl Amplifikat vermischt, 10 µl hiervon wurden in die Geltaschen gefüllt. In jedem Lauf wurde zur Fragmentlängenbestimmung ein Längenstandard (Roth 100 bp Leiter bzw. Boehringer Längenstandard VIII) mitgeführt. Bei einer Spannung von 90 V wurden die Fragmente ca. 60 Minuten aufgetrennt. Die Gele wurden auf einem UV-Transilluminator visualisiert, ausgewertet, durch eine Polaroid-Kamera fotografisch festgehalten und in vorgefertigten Protokollen dokumentiert.

2.6 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Es wurde eine strikte räumliche Trennung der einzelnen Arbeitsschritte Extraktion, Reaktionsmixansatz, Zielsequenzzugabe und Negativ-Kontrollenzugabe mit stationären Arbeitsgeräten (z.B. getrennte Pipettensätze) eingehalten. Die für die PCR und Extraktion verwendeten Reagenzien wurden an einem Reinbeitsplatz in sterile Reaktionsgefäße zu kleinen Mengen portioniert. Für die Extraktion und PCR wurde ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Die Extraktion wurde unter laminar flow-Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt.

2.7 Positiv-, Negativ- und Leerwertkontrollen

Bei der DNA-Extraktion wurden nach jeder zehnten Probe 200 µl steriles Wasser als Leerwert mitgeführt und später in die PCR eingesetzt, um Kreuzkontaminationen aufzuzeigen.

Zehn Mikroliter mit 100 fg gereinigter Plasmid-DNA mit einem Abschnitt des „antigen 2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA), entsprechend des ersten PCR-Produkts, wurden in jedem PCR-Assay als Positivkontrolle verwendet.

In jedem PCR-Lauf wurden außerdem zehn Mikroliter extrahierter, menschlicher Leukozyten-DNA als Negativ-Kontrolle mitgeführt.

In jedem PCR-Lauf wurde ein Leerwert mitgeführt, dem anstelle extrahierter DNA 10 µl Aqua_{bidest} zugegeben wurde. Als Leerwertkontrolle der nested Reaktion wurde 1 µl steriles Wasser eingesetzt.

2.8 Sensitivität und Spezifität

Um mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Pilzen anzuzeigen und die Spezifität der PCR zu testen, wurde extrahierte DNA von Laborstämmen eng verwandter Mitglieder der Familie *Onygenaceae*, sowie extrahierte DNA anderer Pilze in die PCR eingesetzt. Getestet wurden: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Malbranchea spp.*, *Auxarthron spp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. dubliensis* sowie *Chrysosporium parvum*. Die DNA wurde dem beschriebenen Protokoll entsprechend extrahiert. Um die Sensitivität der PCR zu ermitteln, wurde klonierte Plasmid-DNA photometrisch bei 260/280 nm gemessen, eine Verdünnungsreihe erstellt (Faktor 10^{-1}) und in die PCR eingesetzt.

2.9 Sequenzierung

Von den 526 bp langen PCR-Produkten der ersten PCR wurden 35 zufällig ausgewählt und mittels QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Die amplifizierte DNA wurde an eine Siliziummembran gebunden, wohingegen unverbrauchte Reagenzienreste ausgewaschen wurden. Jeweils 10 µl der gereinigten Amplifikate wurde mit 2 µl Ladepuffer gemischt und auf einem 1,75% -igem Agarosegel bei 90 V aufgetrennt. Entsprechend der Intensität der mittels des UV-Transilluminator erkennbaren Banden wurde 1-12 µl des Amplifikats in die Cycle-Sequencing-Reaktion eingesetzt.

Der Cycle-Sequencing-Reaktion liegt der ABI PRISM[®] Big Dye[®] Cycle-Sequencing Ready Reaktion Kit (Perkin Elmer) zugrunde. Die Methode ist eine Weiterentwicklung der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977): Die PCR-Produkte wurden durch im Kit enthaltene fluoreszenzmarkierte 2',3'Dideoxynukleosid-5'Triphosphate markiert. Kommt es in der

Elongationsphase zum Einbau eines dieser fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide, so führt dies zum Kettenabbruch.

Zu 1 –12 µl des gereinigten Amplifikats wurden 4 µl Big Dye[®] und 3 µl des jeweiligen Primers gegeben und mit H₂O_{bidest} auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Das Cycle-Sequencing wurde auf einem Primus-PCR-Thermocycler Tc 9600 durchgeführt. Zunächst wurde 5 Min. bei 96°C denaturiert, dann folgten 25 Zyklen mit Denaturierung bei 96°C für 30 Sekunden, Annealing bei 56°C für 15 Sekunden und Elongation bei 60°C für 4 Minuten. Abschließend wurde 2 Minuten bei 56°C und 5 Minuten bei 60°C erhitzt.

Cycle-Sequencing

Tab.4: Pipettierschema, Endkonzentration der Reagenzien und Temperaturprofil des Cycle Sequencing, basierend auf dem ABI PRISM[®] Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Reagenzien	Menge	Temperaturprofil	
Big Dye [®]	4,0 µl	Denaturierung	5 Min. 96°C
H ₂ O _{bidest}	1 -12 µl	Zyklenzahl	25
Primer	3,0 µl	Denaturierung	30 96°C Sek.
PCR-Amplifikat	1 -12 µl	Annealing	15 56°C Sek.
		Elongation	4 Min. 60°C
Gesamtvolumen	20,0 µl	Extension	2 Min. 56°C 5 Min. 60°C

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden gemäß Herstellerprotokoll mittels Centri-Sep[®]-Zentrifugationssäulen von überschüssigem Big Dye[®] gereinigt.

Die Sequenzierung wurde auf einem ABI 3100 DNA-Sequenzierer (Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Die Sequenzen wurden an beiden Strängen generiert und editiert, anschließend wurde ein Alignment mit der Sequenz-Navigator-Software (Applied Biosystems) durchgeführt. Mit den Sequenzen wurde ein BLAST-Search-Suchprogramm in der GenBank-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Washington D.C.,USA) gestartet.

2.10 Mikrosatelliten

Aufgrund molekularbiologischer Charakteristika werden neuerdings zwei Spezies der Gattung *Coccidioides* unterschieden (Fisher et al., 2002). Mittels Primer wurden Mikrosatelliten amplifiziert, deren Längenunterschiede zur Speziesidentifizierung (*C. immitis*, respektive *C. posadasii*) führen. Diese wurden früher als „Californian- und non-Californian-Strains“ von *C. immitis* bezeichnet. Neben Mutationen in Genen unterschiedlicher Enzyme sind jedoch keine morphologischen Unterschiede der kultivierten Stämme erkennbar. Mit klassischen mykologischen Methoden sind diese Spezies nicht zu unterscheiden.

Verwendete Mikrosatelliten-Primer (Fisher et al., 1999):

621.2 U(FAM): 5´- ACA ATG AAC GAG CAG CAA GG-3´
(20 Basen; Tm: 64°C)

621.2 L: 5´-TGA AAG ATG TGT AGA CCC GA-3´
(20 Basen; Tm: 64°C)

GAC2.1(FAM): 5´-AGG ATG CGA CCG TCC GAG C-3´
(19 Basen; Tm: 58°C)

GAC2.2: 5´-TTT GCG GGA GAA TGG CTT CC-3´
(20 Basen; TM: 58°C)

Für die PCR wurde der AmpliTaq® DNA-Kit eingesetzt. Der Reaktionsmix der Mikrosatelliten-PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, bestehend aus 10 µl DNA- Extrakt und 40 µl Reaktionsmix, hatte eine Endkonzentrationen von 10

mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCl, und 2,5 mM MgCl₂, 1 µM jedes Primers, 1,5 U an AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100 µM jedes Desoxyribonukleosid Triphosphats.

Das PCR-Programm begann mit einer fünfminütigen Denaturierung bei 94°C. Anschließend folgten 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Annealing bei 64°C [621.2-PCR], bzw. 58°C [GAC2-PCR] für 30 Sekunden und DNA-Synthese bei 72°C für 45 Sekunden. Abschließend wurde bei 72°C für 7 Minuten erhitzt.

GAC-Mikrosatelliten-PCR

Tab.5: Pipettierschema, Endkonzentration der Reagenzien und Temperaturprofil der GAC-Mikrosatelliten-PCR

Reagenzien	Menge	Endkonzentration	Temperaturprofil		
H ₂ O _{bidest.}	28,2 µl		Denaturierung	5 Min.	94°C
10x Puffer (pH 8,3)	5,0 µl	10 mM Tris-HCL 50 mM KCL	Zyklenzahl	30	
MgCl ₂ -Lsg.	5,0 µl	2,5 mM	Denaturierung	30 Sek.	94°C
GAC2.1	0,5 µl	1,0 µM	Annealing	30 Sek.	58°C
Gac2.2	0,5 µl	1,0 µM	Elongation	45 Sek.	72°C
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM			
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U	Extension	7 Min.	72°C
Reaktionsmix	40,0 µl				
DNA-Extrakt	10,0 µl				
Gesamtvolumen	50,0 µl				

621.2-Mikrosatelliten-PCR

Tab.6: Pipettierschema, Endkonzentration der Reagenzien und Temperaturprofil der 621.2-Mikrosatelliten-PCR

Reagenzien	Menge	Endkonzentration	Temperaturprofil
H ₂ O _{bidest.}	28,2 µl		Denaturierung 5 Min. 94°C
10x Puffer (pH 8,3)	5,0 µl	10 mM Tris-HCL 50 mM KCL	Zyklenzahl 30
MgCl ₂ -Lsg.	5,0 µl	2,5 mM	Denaturierung 30 Sek. 94°C
621.2U	0,5 µl	1,0 µM	Annealing 30 Sek. 64°C
621.2L	0,5 µl	1,0 µM	Elongation 45 Sek. 72°C
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM	
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U	Extension 7 Min. 72°C
Reaktionsmix	40,0 µl		
DNA-Extrakt	10,0 µl		
Gesamtvolumen	50,0 µl		

Bestimmung der Sequenzlänge

Die Länge der amplifizierten Sequenzen wurde mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies) bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Nukleinsäurenlängenanalyseverfahren. Der Labchip (DNA 1000) trennt Nukleinsäurefragmente mittels Kapillarelektrophorese in einem Chip mit Mikrokanälen auf. Die Daten werden auf einem Rechner erfasst und ausgewertet (Nachamkin et al., 2001).

Die mittels Bioanalyser untersuchten PCR-Produkte waren nicht fluoreszenzmarkiert, die Amplifikate der beiden Mikrosatelliten jedes Stamms wurden durchmischt und gemäß dem Herstellerprotokoll analysiert. Es wurde ein DNA 1000 Assay Kit verwendet, mit dem Sequenzlängen zwischen 25 und 1000 Basenpaaren bestimmt werden können. Zunächst wurde ein LabChip® den Anweisungen des Herstellers entsprechend beladen: nacheinander wurden Gel-Dye, Marker, DNA 1000 Leiter und jeweils 1 µl des PCR-Produkts auf den

LabChip[®] pipettiert, eine Minute mittels eines Vortexers mit Spezialhalterung durchmischt und in den Bioanalyzer gestellt. Die Daten wurden simultan auf den mit dem Analyzer verbundenen Rechner übertragen. Die Fehlerbreite der Analysemethode wird vom Hersteller mit bis zu 10% angegeben.

Zum Vergleich wurde die Länge der Amplifikate beider Mikrosatelliten-PCRs von 25 zufällig ausgewählten Isolaten mit der Originalmethode (Fisher et al., 2002) ermittelt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 6,5% denaturierendem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese dargestellt und aufgetrennt, die Sequenzlänge wurde mit einem ABI 373 Sequenzer (Applied Biosystems) bestimmt. Die Primer (621.2 U bzw. GAC2) wurden hierfür fluoreszenzmarkiert (FAM), der Größenstandard des Polyacrylamidgels war TAMRA- gefärbt.

2.11 Klonierung

Ein Amplifikat der ersten PCR, in welche extrahierte DNA eines *C. posadasii*-Stammes eingesetzt wurde, wurde mittels Qiagen Spin Columns gereinigt. Das Amplifikat wurde in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Klonierungsvektor eingeschleust unter Verwendung des Original TA Cloning[®] Kit und Berücksichtigung der Herstelleranweisungen. Nach Kultivierung und Anzucht der Bakterien wurde die Plasmid- DNA durch das Qiagen Plasmid Maxi Kit gereinigt: Zunächst wurden die Bakterien in alkalischem Milieu lysiert, die DNA isoliert und an ein Anionentauscherharz gebunden, gewaschen und abschließend eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Das amplifizierte Produkt wurde sequenziert, um die Identität mit der Sequenz der GenBank sicherzustellen. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der *Coccidioides*-PCR wurde eine Verdünnungsreihe der klonierten DNA erstellt. Beginnend mit 100 fg/µl wurde die Konzentration in jedem Schritt um den Faktor 10 bis auf 0,01 fg/µl vermindert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch kontrolliert.

2.12 LightCycler –PCR

Für die Hybridization Probes der LightCycler-PCR wurden Sequenzen gewählt, welche innerhalb der durch die beiden nested-Primer amplifizierten Sequenz des „antigen2/proline-rich-antigen“(Ag2/PRA) -Gens liegen:

Cocci-HP-1: 5`-CCA AAT TCT TGC ATC TCG CCC A-[FL]-3`

Cocci-HP-2: 5`-[Red640]-ATG GGA TAA GAT GAG AAG ATG GAA AG-Ph-3`

Der Reaktionsmix der LightCycler-PCR mit einem Gesamtvolumen von 20 µl, bestehend aus 5 µl DNA-Extrakt, 2 µl 10x LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Mix, 3 mM MgCl₂ (Endkonzentration), 0,5 µM jedes Primers (Cocci I und II oder Cocci III und IV) und 0,2 µM jeder Hybridization-Probe (Cocci-HP-1/2). Es wurden sowohl das äußere wie auch das nested Primerpaar der Blockcycler-PCR verwendet.

Die PCR wurde auf einem LightCycler-Gerät der Firma Roche durchgeführt. Das PCR-Programm beginnt mit einer zehnmütigen Denaturierung bei 95°C, um die FastStart-*Taq*-DNA-Polymerase zu aktivieren. Anschließend folgen 50 Zyklen beginnend mit Erhitzen bei 20°C/Sek. auf 95°C und konstant halten dieser Temperatur für 10 Sekunden, Kühlen mit 20°C/Sek. auf 50°C mit 10 Sek.-Temperaturplateau und Erhitzen mit 20°C/Sek. auf 72°C mit 20 Sek.-Temperaturplateau. Die Fluoreszenzwerte jeder LightCycler-Reaktionskapillare wurden nach jedem Annealing-Schritt bei 640 nm gemessen, gespeichert und graphisch der PCR-Zyklenanzahl entsprechend dargestellt. Um Variabilitäten der Kapillarposition oder –geometrie zu minimieren, wurde der Quotient aus absolutem Signal des Reporter-Dye (LightCycler Red 640; Kanal F2) und Signal des Donor-Dye (Fluorescein; Kanal F1) gebildet und auf der y-Achse der LightCycler-Kurve dargestellt. Nach der Amplifikationsphase wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit einer Temperatursteigerungsrate von 0,2°C/Sek. erstellt, um die Schmelzpunkte (T_m) der einzelnen Sequenzen im Bereich der Hybridization Probes zu ermitteln. Für die Schmelzkurvenanalyse wurde die erste negative Abweichung der Fluoreszenz (-dF/dT) gegen die Temperatur aufgetragen und die T_m –Werte wurden manuell durch den Wendepunkt der Kurve festgelegt.

***Coccidioides posadasii* -LightCycler-PCR**

Tab.7: Pipettierschema, Endkonzentration der Reagenzien und Temperaturprofil der *Coccidioides posadasii* -LightCycler-PCR

Reagenzien	Menge	Endkonzentration	Temperaturprofil		
H ₂ O _{bide} st.	8,54 µl		Denaturierung	10	95°C
				Min.	
10xLightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Mix	2,0 µl	1 U	Zyklenzahl	50	
MgCl ₂ -Lsg.	1,6 µl	3 mM	Denaturierung	10	95°C
				Sek.	
Primer Cocci I/III	0,1 µl	0,5 µM	Annealing	10	50°C
				Sek.	
Primer Cocci II/IV	0,1 µl	0,5 µM	Elongation	20	72°C
				Sek.	
Cocci-HP-1	1,33 µl	0,2 µM			
Cocci-HP-2	1,33 µl	0,2 µM			
Reaktionsmix	15,0 µl				
DNA-Extrakt	5,0 µl				
Gesamtvolumen	20,0 µl				

3 Ergebnisse

3.1 Kontrolle der Infektiosität nach Extraktion

Kolonien von *Coccidioides spp.* wuchsen nur von den Kontrollen, d.h. auf den Nährböden, die von *Coccidioides spp.*-Suspensionen ohne weitere Behandlung angelegt wurden. Alle übrigen Kulturen blieben negativ, selbst nach vierwöchiger Inkubation bei 30°C. Folglich führt bereits der erste Extraktionsschritt, die Zugabe von ATL-Puffer zum Abtöten von Arthrokonidien und Myzel. Zusätzlich sind zwei weitere Schritte des Extraktionsprotokolls, die Inkubation im Wasserbad bei 56°C über Nacht und das alternierende Kochen und Einfrieren in insgesamt drei Zyklen, geeignet Pilzkulturen dieses Krankheitserregers ausreichend zu inaktivieren. Somit verbindet das Extraktionsprotokoll, unter Verwendung eines kommerziellen Kits, drei Arbeitsschritte, welche *Coccidioides spp.*-Kulturen erfolgreich abtöten. Es kann daher als sicher betrachtet werden.

3.2 Nachweis von *Coccidioides posadasii* mittels PCR-Verfahren

Nested-PCR und LightCycler PCR. Die 120 *Coccidioides posadasii*-Stämme wurden mit den beschriebenen Methoden untersucht. Die Amplifikate wurden nach der ersten PCR und nach der nested-PCR auf einem Agarosegel aufgetragen. Bei 116 von 120 Stämmen war nach der ersten PCR ein 526 bp-Amplifikat nachweisbar (96,7%). Bei allen 120 Isolaten war nach der nested-PCR ein Amplifikat entsprechender Größe (342 bp) im Gel darstellbar (100%). Alle 120 Stämme waren in der LightCycler PCR positiv.

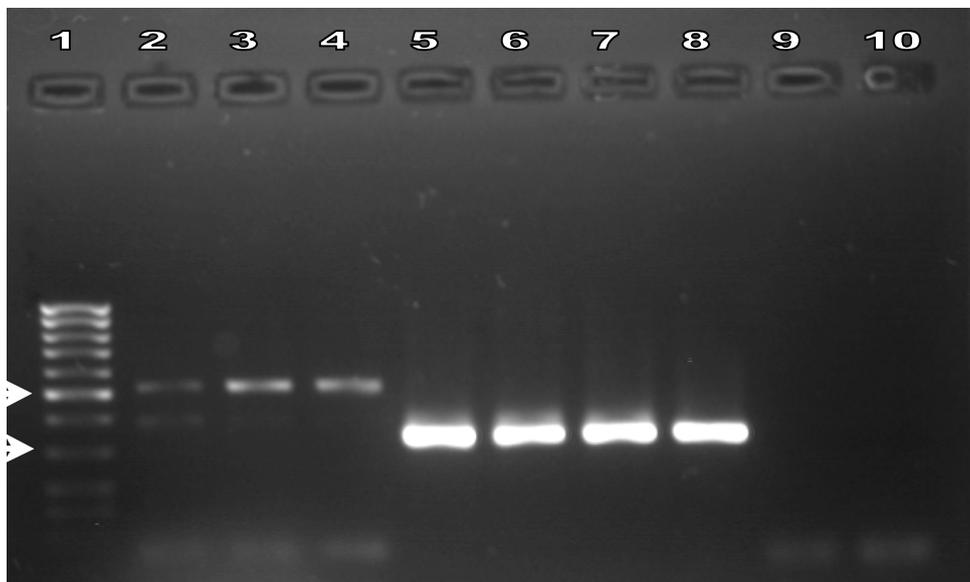


Abb. 2: Darstellung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel. Spur 1: DNA-Marker (500 und 300 bp markiert); Spur 2 – 4 : Amplifikat der ersten PCR drei verschiedener *C. posadasii*-Stämme und Spur 5 – 7 korrespondierende nested-PCR Produkte; Spur 8: Positiv-Kontrolle; Spur 9: Negativ-Kontrolle; Spur 10: PCR-Leerwert

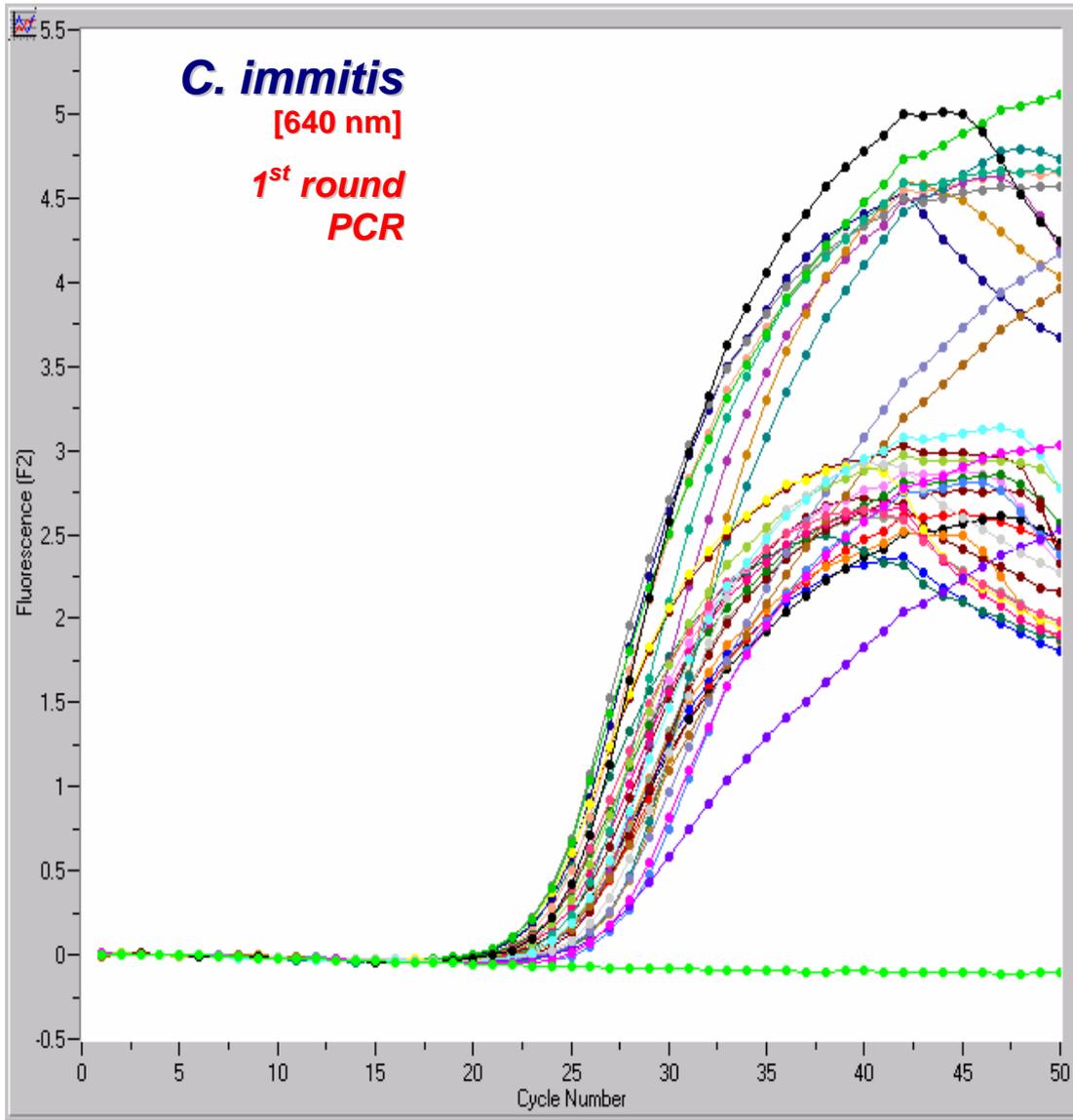


Abb. 3: Darstellung der LightCycler-Kurven von 30 verschiedenen Stämmen; schwarze (oberste) Kurve: Positiv-Kontrolle; grüne Kurve („baseline“): Negativ-Kontrolle; bei allen untersuchten Stämmen ist nach spätestens 30 Zyklen ein Signal erkennbar, die Negativ-Kontrolle produziert auch nach 50 Zyklen kein Signal.

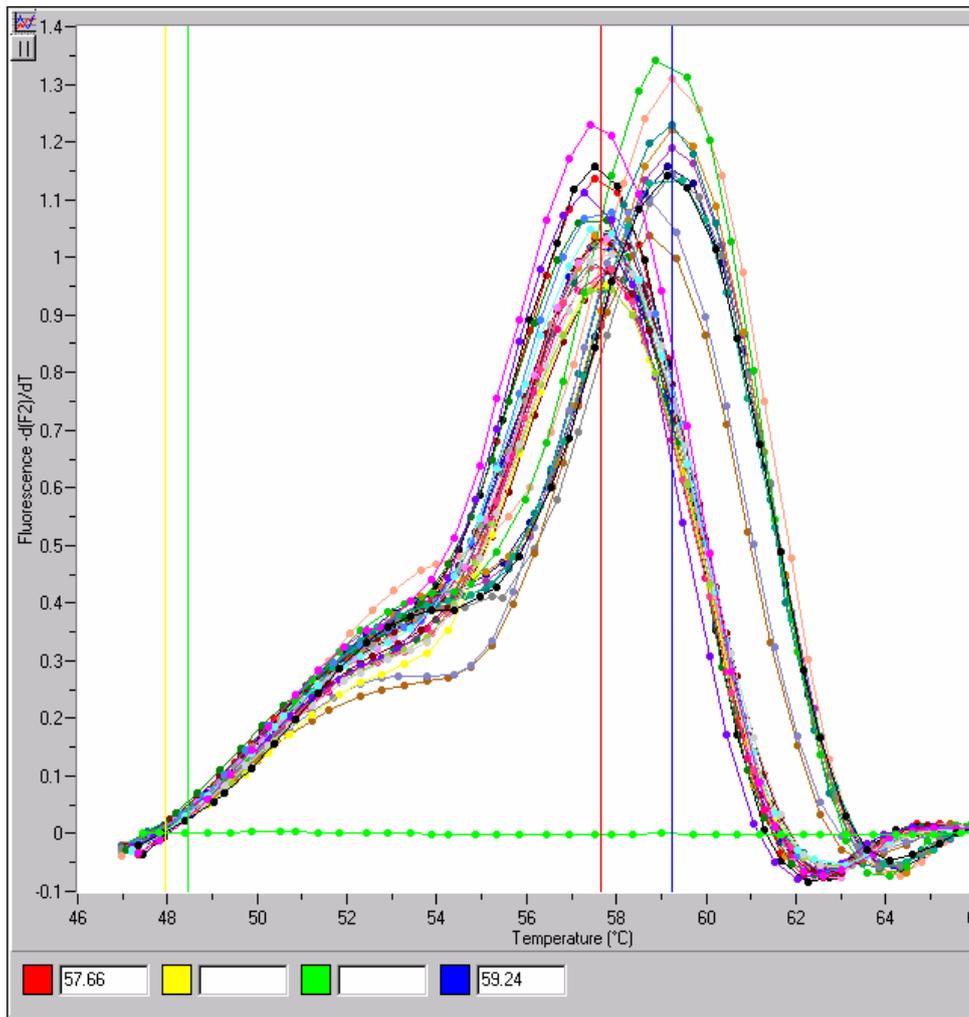


Abb. 4: Korrespondierende Schmelzpunktkurven der 30 Stämme aus Abb.2

35 Amplifikate der ersten *Coccidioides posadasii*-PCR wurden sequenziert. Hierfür wurden sowohl der Vorwärtsprimer Cocci I, als auch der Rückwärtsprimer Cocci II verwendet. Somit konnte das gesamte 526 bp lange Fragment dargestellt werden. Die amplifizierte Sequenz war völlig identisch mit der, in der Genbank des National Center for Biotechnology Information, Washington (NCBI) hinterlegten, Sequenz von *Coccidioides posadasii* (accession number in GenBank: AF013256). Lediglich an Position 1228 in 28 der 35 Amplifikate die Base Cytosin (C) durch Guanosin (G) ersetzt. Dies war der einzige Unterschied, der entdeckt werden konnte. Da die Mutation innerhalb der Genregion lag, an welche die Hybridization-Probes binden, wurde erwartet, diese Mutation gleichfalls durch Schmelzkurvenanalysen nachzuweisen. Die

Untersuchung der Schmelzpunktcurven zeigte eine Verschiebung des Schmelzpunktes von 59°C auf 57°C im Falle einer Mutation C zu G an Position 1228. Die Ergebnisse der Schmelzcurvenanalysen der 35 Stämme stimmten mit den Ergebnissen der Sequenzierung überein. Folglich wurde die Methode der Schmelzcurvenanalyse als geeignet betrachtet, um die Mutation an Position 1228 nachzuweisen. In 89 der 120 Stämmen lag der Schmelzpunkt aufgrund der Mutation bei 57°C, 31 Stämme zeigten einen Schmelzpunkt bei 59°C. Somit war die Mutation an Position 1228 in den 120 getesteten Stämmen fast dreimal so häufig wie die in der GenBank -Datenbank hinterlegte Sequenz. Allerdings ist die Nukleotidposition 1228 Bestandteil eines Introns (Peng et al., 1999), so dass es sich um eine stumme Mutation handelt.

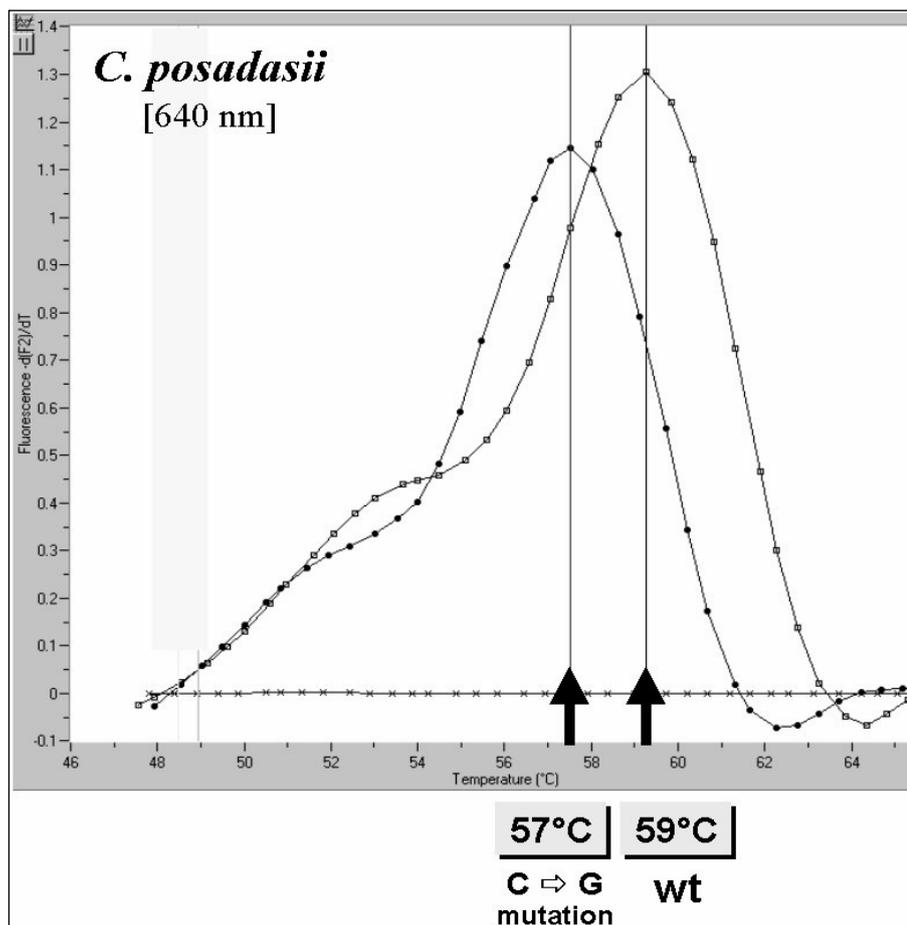


Abb. 5: Darstellung der Schmelzpunktverschiebung von 59°C auf 57°C im Falle einer Mutation C zu G an Position 1228

Kontrollen Alle Proben mit Plasmid-DNA von *Coccidioides posadasii* waren positiv, so dass fehlerhafte Ergebnisse durch unzureichende PCR-Bedingungen, bzw. –Bestandteile nicht beobachtet wurde.

Die eingesetzten Negativkontrollen und Leerwerte waren allesamt negativ, womit Kreuzreaktionen zwischen humaner DNA und den verwendeten Primern und Kontaminationen während des Extraktionsvorgangs weitgehend ausgeschlossen werden können. Aufgrund negativer Reaktions-Leerwerte, sowohl der ersten, als auch der nested-PCR, konnten keine Kontaminationen während der Versuchsansätze nachgewiesen werden.

DNA von *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Chrysosporium parvum*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliensis*, *Malbranchea spp.* und *Auxarthron spp.* wurden mit der *Coccidioides posadasii*-PCR nicht amplifiziert. Damit können Kreuzamplifikationen mit DNA verwandter Pilzspezies weitgehend ausgeschlossen werden.

Um die Sensitivität zu bestimmen, wurde eine definierte Menge klonierter *Coccidioides posadasii*-DNA in die PCR eingesetzt. In der ersten PCR konnte noch mit 100 fg klonierter Plasmid DNA ein Amplifikat nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze konnte in der nested PCR um den Faktor 100 erhöht werden. Somit konnte eine Nachweisgrenze von 1 fg spezifischer DNA in 10 µl Extraktionsvolumen, was einer bis zehn Genkopien entspricht, für die konventionelle nested PCR ermittelt werden.

3.3 Identifizierung der Spezies mittels Längenbestimmung zweier Mikrosatelliten

Alle 120 Stämme wurden mit der GAC-, bzw. 621.2-PCR untersucht. Der Erfolg der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft. Bei 117 von 120 Stämmen in der 621.2-PCR und 116 von 120 Stämmen in der GAC-PCR konnte ein Amplifikat im Gel nachgewiesen werden. Der Versuch, beide Primerpaare in einen PCR-Ansatz zu bringen, war erfolgreich; mit dem Programm der GAC-PCR konnten beide Mikrosatelliten simultan amplifiziert werden.

Die Länge der PCR-Produkte wurde mittels eines Bioanalyzers ermittelt. Bei 117 von 120 Amplifikaten konnte ein Längenbestimmung durchgeführt werden. Die Längenverteilung stellt sich wie folgt dar:

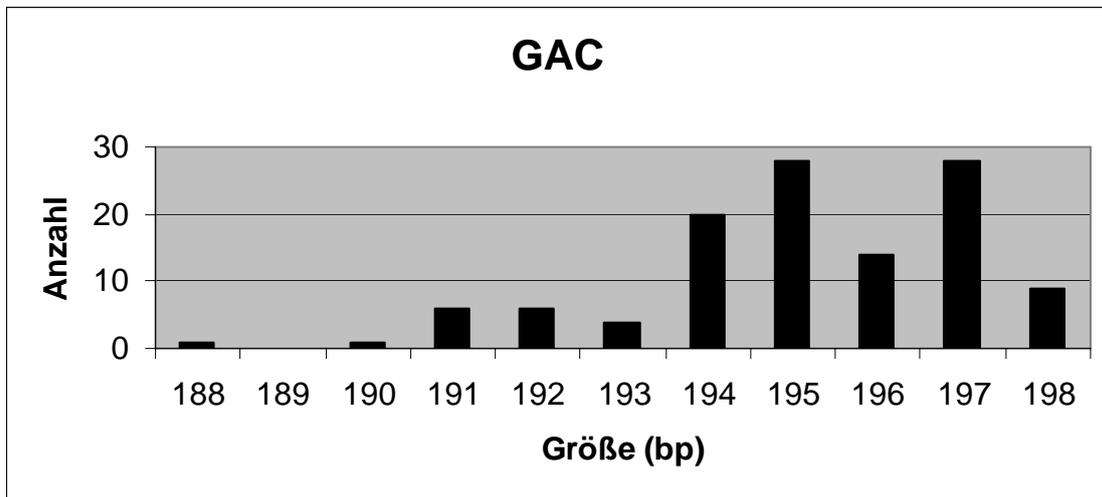


Abb. 6: Größenverteilung aller amplifizierten GAC-PCR-Produkte auf dem Agilent- Bioanalyzer

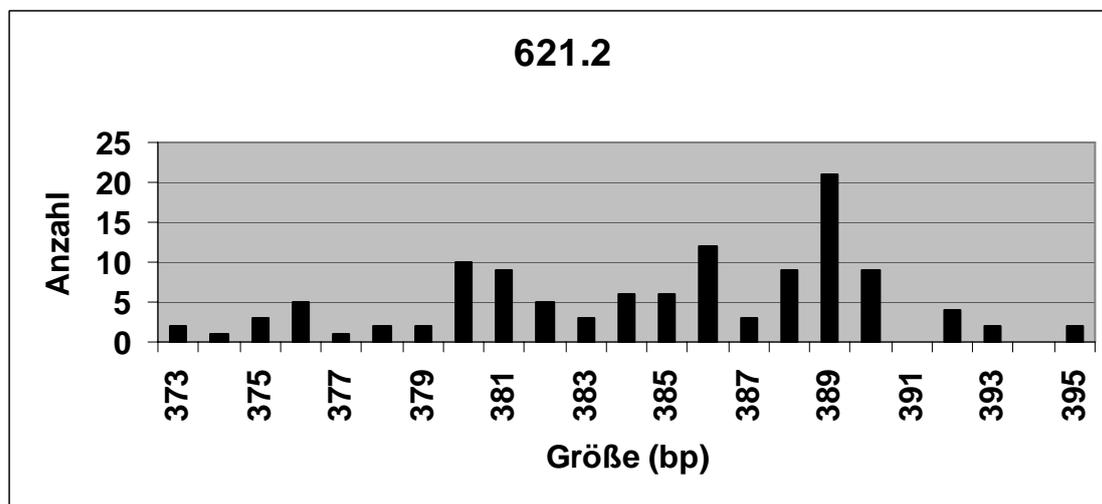


Abb. 7: Größenverteilung aller amplifizierten 621.2-PCR-Produkte auf dem Agilent- Bioanalyzer

Die Analyse der Fragmentlänge mittels LabChip-Bioanalyzermethode zeigte Fragmentlängen des GAC-PCR-Amplifikats zwischen 188 und 198 bp. Für das 621.2-PCR-Amplifikat konnten Fragmentlängen zwischen 373 und 395 bp bestimmt werden.

Die Fragmentlänge wurde bei jeweils 25 Amplifikaten auf einem Polyacrylamidgel gemäß der Referenzmethode (Fischer et al., 1999) bestimmt. Die Amplifikate der GAC-PCR waren alle 206 bp lang. Die Länge der 621.2-Fragmente lag bei 398-399 bp.

Die in der Literatur (Fisher et al. 2002) angegebenen, zu erwartenden Fragmentlängen betragen für das GAC-Fragment 206 bp (*C. posadasii*), bzw. 216-228 bp (*C. immitis*) und für das 621.2-Fragment 397-401 bp (*C. posadasii*), bzw. 414-426 bp (*C. immitis*). Folglich konnten alle 25 untersuchten Stämme, aufgrund der Längenanalyse mittels Polyacrylamidgelmethode, der Spezies *Coccidioides posadasii* zugeordnet werden.

Die Länge GAC- bzw. 621.2-PCR-Amplifikate dieser 25 Stämme wurde auch mittels LabChip-Bioanalyzermethode ermittelt.

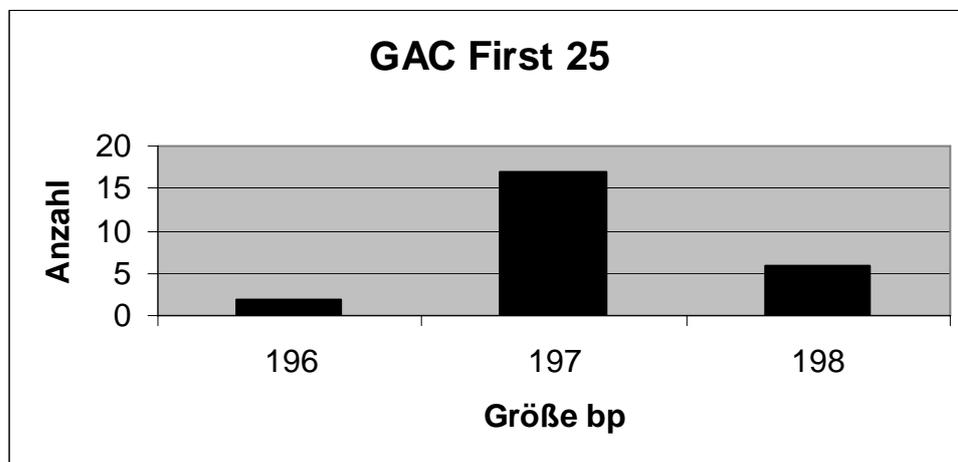


Abb. 8: Größenverteilung der 25 mit beiden Methoden untersuchten GAC-PCR-Amplifikate; dargestellt ist hier das Ergebnis der Untersuchung auf dem Agilent-Bioanalyzer.

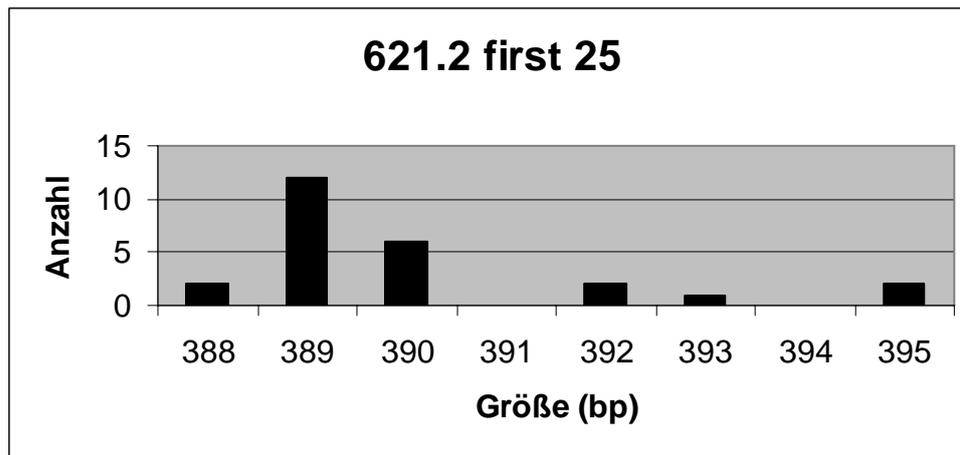


Abb. 9 : Größenverteilung der 25 mit beiden Methoden untersuchten 621.2-PCR-Amplifikate; dargestellt ist hier das Ergebnis der Untersuchung auf dem Agilent-Bioanalyzer.

Die Untersuchung der 25 Stämme mittels Bioanalyzer ergab eine Verteilung der Fragmentlängen von 196-198 bp für das GAC-Fragment und 388-395 bp für das 621.2-Fragment. Somit kann die Identifizierung der Stämme als *Coccidioides posadasii* mittels LabChip-Bioanalyzer-Methode bestätigt werden. Da die Größenverteilung der restlichen 92 Stämme, die nur mittels LabChip-Bioanalyzer-Methode untersucht wurden, innerhalb oder sogar unter der Fragmentlängenspanne der 25 mit beiden Methoden untersuchten Stämmen liegt, können die restlichen Stämme ebenfalls als *Coccidioides posadasii* klassifiziert werden. Bei drei Stämmen konnte keine Amplifikation der Mikrosatelliten erreicht werden, so dass eine Speziesidentifizierung nicht möglich war.

Der Versuch die Länge der GAC-Mikrosatelliten mittels Sequenzierung zu bestimmen war erfolglos, vermutlich weil es sich bei dem amplifizierten Genabschnitt um hochrepetitive Sequenzen handelt.

3.4 Diagnostische PCR

Ein spezifisches 342 bp-Amplifikat der nested PCR konnte aus drei in Paraffin eingebetteten Organbiopsien, in welchen mikroskopisch Sphärulen identifiziert worden waren, nachgewiesen werden.

Die Untersuchung von extrahierter DNA aus formalinfixierten, paraffin-eingebetteten mikroskopisch- und spezifische-PCR-positiven Organbiopsien anderer dimorpher Pilze (*Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Blastomyces dermatitidis*) mit der *Coccidioides immitis*-PCR blieb negativ. Es konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden.

Die Amplifikation von Mikrosatelliten aus Gewebeproben war nicht erfolgreich. Die Primer amplifizierten verschiedene Produkte unterschiedlicher Größe, von denen keines die erwartete Basenpaarlänge hatte. Eine Identifizierung der *Coccidioides*-Art war daher nicht möglich.

4 Diskussion

4.1 Extraktion

Die Grundvoraussetzung für die Durchführung dieser Arbeit war der Nachweis einer sicheren DNA-Extraktionsmethode. Pilze der Gattung *Coccidioides* unterliegen strengen Sicherheitsbestimmungen, die Anzucht und das Arbeiten mit infektiösem Material dürfen nur in Laboratorien der biologischen Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden. Die Sicherheit der Extraktion ist entscheidend beim Umgang mit extrahierter DNA aus Kulturen dieses gefährlichen Krankheitserregers.

Das grundlegende Problem des Nachweises von fungalen Krankheitserregern mittels PCR liegt im strukturellen Aufbau der Pilze begründet: Anders als etwa Bakterien oder intrazellulär lebende Viren besitzen Pilze eine Zellwand aus Polysacchariden, Mannoproteinen und Chitinpolymeren. Diese Zellwand ist extrem resistent gegenüber Umwelteinflüssen, muss aber um die intrazellulär gelegene DNA nachweisen zu können, zerstört werden. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Destruktion von Pilzzellwänden lassen sich in vier Gruppen einteilen: thermische, mechanische, enzymatische und chemische Verfahren. Häufig werden in DNA-Extraktionsverfahren mehrere dieser Prinzipien kombiniert. Ein gebräuchliches Verfahren ist das enzymatische Abbau der Zellwände mittels Lyticase (β -Glucuronidase aus *Arthrobacter luteus*), Zymoliase (β -1,3-Laminaripentahydrolase aus *Arthrobacter luteus*) oder Yeast lytic enzyme (Protein mit Zellulase-, Proteinase- und Chitinaseaktivität aus *Trichoderma harzianum*). Hierbei entstehende Sphäroblasten können mittels Proteinase K weiterverdaut werden. Andere Extraktionsverfahren basieren auf chemisch-thermischen Methoden der Zellwanddestruktion, etwa Erhitzen in 50 mM Natronlauge (Löffler, 1997), mechanisch-chemischen Verfahren, unter Verwendung von Glaskugeln („glasbeads“) und gesättigtem Phenol (Colonna-Romano et al., 1998) und mechanisch-thermische Methoden

mit Glaskugeln und Flüssigstickstoff (Nagai et al., 1999; Yamakami et al., 1996) oder Mikrowellenbehandlung bei 200 Watt (Kappe et al., 1998).

Das modifizierte Protokoll des QIAamp[®]Tissue Kit, ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktions-Kits muß als sehr sicher betrachtet werden, aufgrund der Kombination von drei Extraktionsschritten, von denen jeder für sich in der Lage ist *C. posadasii* in seiner Myzelform erfolgreich abzutöten. Um die DNA aus der Zelle zu isolieren, wird jede Probe für mindestens 11 Minuten gekocht, unterbrochen von Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, dies hemmt erfolgreich das Wachstum von *C. posadasii*. Dieses Extraktionsverfahren bedient sich physikalischer Prinzipien zur Destruktion von Pilzwänden: Das rasche Erhitzen und Abkühlen durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließendem Kochen im Wasserbad erzeugt mechanischen Stress in den Wandstrukturen der Zellorganellen und führt vermutlich zu Mikroeinrissen in Zellwand und Kernmembran. Das Kochen für 15 bis 20 Minuten ist ein sicheres Verfahren, um Suspensionen von *C. posadasii* in der Myzelphase abzutöten (Gromadzki et al., 2000; Valesco et al., 1997). Sowohl die Zugabe von ATL-Puffer als auch die Inkubation über Nacht bei 56°C können Suspensionen von *C. posadasii* erfolgreich abtöten. Der zusätzliche Effekt des Einfrierens in flüssigem Stickstoff wurde hier nicht weiter untersucht. Das sichere Verfahren des Einfrierens von flüssigen *Coccidioides* spp-Kulturen in flüssigem Stickstoff mit anschließender Lyophilisierung vor der DNA-Extraktion wurde beschrieben (Burt et al., 1995). Diese Verfahren kann für Kulturen angewandt werden, es wurde bislang jedoch nicht für die Untersuchung klinischen Materials eingesetzt. Im Gegensatz dazu konnte, mit dem hier verwendete Protokoll, Pilz-DNA erfolgreich aus nativem, gefrorenem und Formalin-fixiertem, menschlichem und tierischem Gewebematerial extrahiert werden (Bialek et al., 2003; Bialek et al., 2000; Bialek et al., 2002b; Bialek et al., 2001). In infiziertem Zellmaterial werden gewöhnlich Sphärulen gefunden, welche als nicht-infektiös gelten. Allerdings wurde von *Coccidioides*-Hyphen in klinischem Untersuchungsmaterial berichtet, was ein sicheres Extraktionsverfahren notwendig macht (Wages et al., 1995). Obwohl dies in dieser Arbeit nicht getestet wurde, scheint das Extraktionsverfahren geeignet,

um die DNA von *Coccidioides*- Stämmen mittels AccuProbe zu testen und somit falsch-negative Ergebnisse aufgrund von durch Formalin abgetöteten Stämmen zu vermeiden (Gromadzki et al., 2000).

4.2 Nested PCR und LightCycler PCR

Seit Ausgang des vorigen Jahrhunderts wurden viele PCR-Verfahren zum Nachweis von systemischen Mykosen veröffentlicht. Das Hauptaugenmerk der Forschung galt der Entwicklung eines Nachweisverfahrens der invasiven Aspergillose (Yamakami et al., 1998; Reddy et al., 1993) und Candidiasis (Wahyuningsih et al., 2000; Holmes et al., 1994). Eine diagnostische PCR zum Nachweis einer Kokzidioidomykose wurde bislang nicht publiziert.

Prinzipiell steht am Anfang der Entwicklung einer diagnostischen PCR die Überlegung welche Zielregion gewählt werden soll. Einerseits kann man eine Genregion wählen, die für ein Protein kodiert, das spezifisch für die jeweilige Spezies ist. Kreuzreaktionen oder falsch positive Ergebnisse können damit weitgehend ausgeschlossen werden. Der Nachteil einer solch spezifischen Zielregion allerdings ist, dass möglicherweise nur wenige Kopien pro Genom vorliegen und demzufolge die Sensitivität erniedrigt sein könnte. Die zweite Alternative wäre eine stabile Gensequenz zu wählen, deren Kopien pro Genom in hoher Anzahl vorliegen. Aufgrund der Menge des genetischen Materials kann mit einer hohen Sensitivität gerechnet werden. Unglücklicherweise kodieren solch hochrepetitiven Sequenzen in aller Regel für Proteine, die evolutionsgeschichtlich konserviert sind und in nahezu unveränderter Weise in einer Vielzahl unterschiedlichster Organismen vorkommen. Die hohe Sensitivität dieser Zielregion ist daher häufig mit einer niedrigen Spezifität verbunden.

In dieser Studie werden eine konventionelle nested PCR und eine LightCycler-PCR, deren Zielregion das Gen ist, welches für das „antigen2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA) von *C. posadasii* kodiert, beschrieben.

Spezifität: Alle 120 untersuchten Stämme wurden als *Coccidioides spp* identifiziert. Bei dem „antigen2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA) handelt es sich um eine konstante Genregion, die sowohl in nicht-kalifornischen Stämmen,

neuerdings als *C. posadasii* bekannt, als auch in kalifornischen Stämmen, welche jetzt als *C. immitis* bezeichnet werden, konserviert ist (Peng et al., 1999). Aufgrund dieser Tatsache kann erwartet werden, mit diesen PCR-Verfahren beide *Coccidioides*-Spezies nachweisen zu können, auch wenn in dieser Studie nur DNA von nicht-kalifornischen *Coccidioides* Stämmen untersucht wurde. Da das „antigen2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA) als spezifisch für *Coccidioides* spp gilt, können diese neu entwickelten PCR-Verfahren gleichfalls als spezifisch betrachtet werden. Um mögliche Kreuzreaktivitäten des PCR-Verfahrens mit anderen Pilzspezies zu untersuchen wurde DNA von verwandten Mitgliedern der Familie *Onygenaceae* getestet. Hierfür wurde extrahierte DNA *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Malbranchea* spp. und *Auxarthron* spp. in die PCR eingesetzt. Ebenfalls getestet wurde DNA von *Chrysosporium parvum*, da deren Kolonien mit *Coccidioides* spp. verwechselt werden können. Da geringe Homologien einer Sequenz, die bei *Candida* spp. für ein Oberflächenprotein kodiert, mit dem Ag2/PRA-Gen beschrieben wurden (Lamarre et al., 2000), wurde zum Ausschluss möglicher Kreuzreaktionen, extrahierte DNA von *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. dubliensis* in die PCR eingesetzt. Wie, aufgrund der Wahl der Zielregion dieser PCR nicht anders zu erwarten, konnte keine DNA von verwandten oder morphologisch ähnlichen Pilzspezies amplifiziert werden. Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen wurde keine Kreuzreaktivität der Primer, weder der ersten PCR, noch der nested Primer, mit humaner DNA beobachtet.

Primer, welche in Genregionen liegen, die in vielen verschiedenen Spezies unverändert konserviert vorkommen, können DNA verwandter, nichtkrankheitserregender Pilze amplifizieren (Bialek et al., 2002b). Auch die Unterscheidung von verwandten Pilzerregern, die von hoher klinischer Bedeutung ist, gelingt mit derartigen Primern nicht. In Voruntersuchungen amplifizierten *C. posadasii* 18s rDNA-komplementäre Primer auch DNA verwandter Pilze, humane DNA und DNA von Mäusen (unveröffentlichte Daten).

Eine alternative Zielregion der PCR wäre das Komplementbindende-Antigen von *C. immitis*, welches gleichfalls als immunreaktiv und spezifisch bekannt ist (Yang et al., 1996). Das Antigen wurde als Chitinase mit hoher Homologie zu Chitinasen anderer Pilze identifiziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß Antikörper von Patienten mit Infektionen anderer dimorpher Pilze mit dem klonierten, d.h. nicht-glykosylierten, Protein kreuzreagieren (Yang et al., 1999). Daher waren Kreuzreaktionen mit DNA-Fragmenten anderer dimorpher Pilze zu erwarten, so dass dieses Gen nicht als Zielsequenz verwendet wurde.

Sensitivität: Die Wahl eines spezifischen Gens als Zielregion einer diagnostischen PCR kann die Sensitivität im Vergleich zu PCRs, deren Zielregionen hochrepetitive ribosomale RNA-Gene darstellen, vermindern (Makimura et al., 1994). In 116 von 120 Stämmen von *Coccidioides posadasii* war nach der ersten PCR ein 526 bp langes Amplifikat nachweisbar. In der nested PCR war von allen 120 Isolaten ein 342 bp großes Amplifikat darstellbar.

Um den hohen Ansprüchen der klinischen Diagnostik zu genügen, muß eine hoch-spezifische und –sensitive PCR entwickelt werden. Gemäß Peng (1999), wird nur eine Kopie des „antigen2/proline-rich antigen“ pro Genom erwartet. Wie in dieser Studie anhand klonierter DNA gezeigt wurde, kann die Sensitivität einer konventionellen PCR um das hundertfache gesteigert werden durch den Einsatz einer nested PCR. Die Nachweisgrenze von 1 fg klonierter DNA liegt im Bereich anderer diagnostischer nested PCRs, deren Zielsequenzen ebenfalls als einfache Kopie vorliegen (Bialek et al., 2003; Bialek et al., 2002a). Zusätzlich kann eine hohe Anzahl von Genomen in klinischem Probenmaterial erwartet werden, da die Sphärulen eine Vielzahl an Endosporen und somit auch zahlreiche Genome enthalten.

Die Untersuchung der wenigen, in Paraffin eingebetteten, klinischen Proben konnte die Sensitivität und Spezifität der konventioneller nested PCR im klinischen Untersuchungsmaterial nur andeuten. PCR-Verfahren zur Bestimmung humanpathogener Pilze sind von großer klinischer Bedeutung,

insbesondere, da *Coccidioides* spp im histologischen Untersuchungsmaterial leicht mit anderen dimorphen Pilzen verwechselt werden können (Kaufman et al., 1998). Da sich Therapie und Prognose unterscheiden, können entsprechende Methoden zum Nachweis der unterschiedlichen dimorphen Pilze von großer Wichtigkeit sein. Dies gilt insbesondere in nicht-endemischen Gebieten, in welche die Kokzidioidomykose importiert werden kann, die Diagnose aber selten gestellt wird (Schneider et al., 1997; Cairns et al., 2000; Stanaert et al., 1995). Nach Europa wird die auf dem amerikanischen Kontinent erworbene Kokzidioidomykose nur selten importiert (Anonymus, 2001). Es bestehen zudem nur begrenzte Möglichkeiten der Kultivierung des Erregers, da dies nur unter den strengen Sicherheitsauflagen eines Labors der biologischen Sicherheitsstufe 3 möglich ist. Das diagnostische Potential der konventionellen nested PCR und der LightCycler-PCR muss jedoch erst noch in Studien bestätigt werden.

LightCycler-PCR: Die Entwicklung des revolutionären Verfahrens der Polymerase-Ketten-Reaktion durch Kary B. Mullis setzte neue Maßstäbe in der molekularbiologischen Diagnostik. Minimale Erregermengen sind ausreichend zur sicheren und schnellen Identifizierung des krankheitsauslösenden Organismus. Dieses, auf einem konventionellen Blockcyclers durchgeführte, Verfahren wurde weiterentwickelt. Die LightCycler-PCR ermöglicht die Analyse extrahierter DNA in Echtzeit von bis zu 32 Proben. Die Daten werden simultan auf einen Rechner übertragen und dort ausgewertet, so dass die Analyse der PCR-Produkte etwa auf einem Agarosegel nicht erforderlich ist. Zusätzlich ermöglichen Schmelzpunktanalysen Rückschlüsse auf Basensequenzen. Mit der in dieser Studie entwickelten LightCycler-PCR konnten alle 120 Stämme amplifiziert werden.

Sequenzierung: Die Sequenzierung sollte die Frage klären, ob es sich bei dem 526 bp langen Fragment der ersten PCR um eine *Coccidioides* spp-spezifische Sequenz, um die Sequenz einer verwandten Pilzspezies oder um unspezifische Amplifikationen handelt. Hierfür wurden die Amplifikate von 35 Stämme

sequenziert. Um das gesamte Amplifikat darstellen zu können, wurde die Sequenzierung sowohl mit dem Vorwärtsprimer Cocci I, als auch mit dem Rückwärtsprimer Cocci II durchgeführt. Die sequenzierten PCR-Amplifikate waren völlig identisch mit der in der Genbank des National Center for Biotechnology Information, Washington D.C. (NCBI) hinterlegten Sequenz von *Coccidioides posadasii* (Gen Accession N^o AF013256), lediglich an Position 1228 war bei 28 von 35 Stämmen die organische Base Cytosin (C) durch Guanosin (G) ersetzt. Die Mutation lag innerhalb der Bindungsregion der Hybridization-Probes. Somit stand eine weitere Methode zum Nachweis der Mutation zur Verfügung. Die Untersuchung der Schmelzpunktkurven zeigte eine Verschiebung des Schmelzpunktes von 59°C auf 57°C im Falle einer Mutation C zu G an Position 1228. Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalysen der 35 Stämme stimmten mit den Ergebnissen der Sequenzierung überein. Folglich wurde die Methode der Schmelzkurvenanalyse als geeignet betrachtet, um die Mutation an Position 1228 nachzuweisen. In 89 der 120 Stämmen lag der Schmelzpunkt aufgrund der Mutation bei 57°C, 31 Stämme zeigten einen Schmelzpunkt bei 59°C. Somit war die Mutation an Position 1228 in den 120 getesteten Stämmen fast dreimal so häufig wie die in der GenBank -Datenbank hinterlegten Sequenz. Allerdings ist die Nukleotidposition 1228 Bestandteil eines Introns (Peng et al., 1999), so dass es sich um eine stumme Mutation handelt.

4.3 Mikrosatelliten

In der Gattung *Coccidioides* werden zwei *Coccidioides*-Spezies unterschieden: *C. immitis* und *C. posadasii*. Die Unterschiede der beiden Spezies beruhen auf Längenpolymorphismen bestimmter Allele. Evolutionsbiologische Untersuchungen vermuten den Zeitpunkt der Speziesseparierung in kalifornische- (*C. immitis*) und nichtkalifornische Stämme (*C. posadasii*) vor 11 bis 12,8 Millionen Jahren (Fisher et al., 2001; Koufopanou et al., 1997). Die Unterscheidung zweier *Coccidioides*-Spezies ist von enormem Interesse für die Evolutionsforschung, aber die klinische Bedeutung dieser Unterscheidung

scheint begrenzt, da es keine signifikanten Unterschiede in der von ihnen verursachten Erkrankung zu geben scheint. Des Weiteren bleibt die Bestimmung der Länge der Mikrosatelliten der Kultur vorbehalten, da die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen darauf hindeuten, dass die zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Loci verwendeten Primer nicht in der Lage sind, analysierbare PCR-Produkte aus klinischem Material zu amplifizieren. Aufgrund von unspezifischen Kreuzreaktionen mit humaner DNA konnte kein zur Untersuchung der Längenunterschiede geeignetes PCR-Produkt amplifiziert werden. Deshalb scheinen retrospektive Speziesidentifizierungen aus histopathologischem Material bekannter *Coccidioides*-Infektionen nicht möglich.

Wie aufgrund umfangreicher geographischer Studien erwartet (Fisher et al., 2002), konnten 117 von 120 Stämmen, die in Monterrey, Nuevo Leon (Nordmexiko) isoliert wurden, als *C. posadasii* identifiziert werden. Die durch die Originalmethode unter Verwendung eines ABI Sequenzers und fluoreszenzmarkierter Primer ermittelten Größen der Mikrosatelliten lagen exakt innerhalb der beschriebenen Größenspanne. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der Mikrosatellitenlänge durch das zeitsparende LabChip 2100 Bioanalyser System unterschiedliche Ergebnisse. Laut Herstellerangaben können die Sequenzlängen eine Variabilität von 5 bis 10% aufweisen. Die Längenbestimmungen der untersuchten Mikrosatelliten lagen im unteren Bereich der erwarteten Sequenz, welche für die Speziesidentifizierung herangezogen wird. Es muss jedoch noch gezeigt werden, ob das LabChip-System geeignet ist, Mikrosatelliten von *C. immitis*, deren Größendifferenz mindestens 12 bzw. 19 Nukleotide beträgt, eindeutig von den Mikrosatelliten von *C. posadasii* zu unterscheiden. Aufgrund von Störfaktoren war es uns unmöglich die Amplifikate der Mikrosatelliten direkt zu sequenzieren und somit die Länge auf diese Weise zu ermitteln. Bei drei Stämmen gelang die Amplifikation von mikrosatellitenträgenden Genabschnitten nicht, was auf die insgesamt nur sehr spärliche extrahierte DNA-Menge zurückgeführt wurde. Da die Stämme nicht transportiert wurden, war eine erneute Extraktion in Tübingen nicht möglich.

4.4 Fazit

In dieser Arbeit wird die Entwicklung einer konventionellen nested PCR und einer LightCycler PCR zur spezifischen Identifizierung von *Coccidioides posadasii* DNA mit dem Gen des einzigartigen „antigen2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA) als Zielsequenz beschrieben. Untersuchungen zeigten im Ansatz das diagnostische Potential dieser PCR-Methoden spezifische *Coccidioides*-DNA im Gewebematerial nachzuweisen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mittels eines modifizierten, kommerziell erhältlichen DNA-Extraktions-Kits, Kulturen von *C. posadasii* sicher inaktiviert werden können.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zum spezifischen Nachweis von DNA des dimorphen Pilzes *Coccidioides posadasii*. Er verursacht die ausschließlich auf dem amerikanischen Kontinent in wüstenartigen Regionen endemische Kokzidioidomykose. Die Diagnostik dieser gelegentlich nach Europa importierten Systemmykose beschränkt sich auf immundiagnostische Tests und die Erregeranzucht. Neben der mäßigen Sensitivität dieser Verfahren ist die Kultur noch dadurch limitiert, dass *C. posadasii* ausgesprochen infektiös ist und die Anzucht auf Laboratorien der biologischen Sicherheitsstufe 3 beschränkt ist.

Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer PCR war daher der Nachweis, dass die angewandte Methode nicht nur erfolgreich DNA extrahiert sondern auch, dass das Probenmaterial sicher nicht mehr infektiös ist. Es wurden Suspensionen von 10 verschiedenen *C. posadasii*-Stämmen unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen hergestellt und nach einem modifizierten kommerziellen DNA-Extraktionsprotokoll bearbeitet. Zur Zerstörung der Pilzzellwände wurden drei Zyklen bestehend aus Einfrieren in Flüssigstickstoff und Kochen eingefügt. Die parallel bearbeiteten Suspensionen wurden nach jedem Schritt erneut kultiviert, um die Vitalität und damit die Infektiösität nachzuweisen resp. auszuschließen. Pilze waren nur aus unbehandelten Suspensionen wieder anzüchtbar, während alle anderen Kulturen steril blieben. Damit gelang der Nachweis, dass mindestens drei Schritte des Extraktionsprotokolls jeweils alleine bereits ausreichend sicher die Infektiösität der Proben eliminieren.

Daraufhin wurde die DNA aus 120 klinischen Isolaten von *C. posadasii* aus dem Endemiegebiet in Monterrey in Mexiko nach diesem Protokoll extrahiert. Zusätzlich wurden Gewebeproben untersucht, in denen entweder mikroskopisch eine Kokzidioidomykose diagnostiziert oder eine andere Systemmykose identifiziert worden war.

Für die in dieser Arbeit entwickelten PCR-Verfahren wurde die Zielsequenz in einem Gen gewählt, welches für das erregerspezifische „antigen 2/proline-rich antigen“ (Ag2/PRA) kodiert. Während das erste PCR Produkt 526 Basenpaare lang ist, weist das nested Produkt 342 Nukleotide auf. Die Hybridisierungssonden des real-time PCR-Verfahrens (LightCycler) sind komplementär zu Nukleotidregionen innerhalb des Nested-PCR Produktes. Mit beiden PCR-Verfahren konnte DNA aus allen 120 Stämmen amplifiziert werden, während das mit DNA aus Stämmen anderer Pilzgattungen nicht gelang. Die Sequenzierung des 526 bp langen Amplifikates der ersten PCR von 35 zufällig ausgewählten Isolaten und die Schmelzkurvenanalyse der Light-Cycler PCR aller 120 Stämme zeigten entweder eine 100% Übereinstimmung mit der Gensequenz von *C. posadasii* (accession number in GenBank: AF013256) oder eine einzige stumme Mutation ausschließlich in der Nukleotidposition 1228 (Guanosin statt Cytosin). Neben der hohen Spezifität der PCR-Verfahren konnte mittels klonierter Plasmid-DNA auch die Sensitivität des konventionellen PCR-Verfahrens bestimmt werden, die ein Detektionslimit von 1 fg aufwies.

Die zwei Spezies der Gattung *Coccidioides* werden anhand zweier Mikrosatelliten-tragender Gene (GAC und 621.1) unterschieden. Durch die Längenbestimmung beider Mikrosatelliten wurden 117 von 120 in dieser Arbeit untersuchten Isolate als *C. posadasii* identifiziert.

Mit der konventionellen nested-PCR konnte spezifische *Coccidioides*-DNA aus drei histologisch als Kokzidioidomykose identifizierten Gewebeproben amplifiziert werden, während die DNA aus 20 paraffin-eingebetteten Gewebeproben mit anderen Systemmykosen negativ blieben. Das damit erkennbare diagnostische Potenzial der neu etablierten PCR-Verfahren zum Nachweis von *Coccidioides* spp. bleibt in Studien anhand klinischer Materialien weiter zu evaluieren.

6 Literaturverzeichnis

1. **Anonymus.** 2001. Cases of coccidioidomycosis in Europe due to exposure in California, United States. *Eurosurveillance Weekly* **5**: Issue 50.
2. **Arsura, E. L., W. B. Kilgore, und S. N. Ratnayake.** 1998. Erythema nodosum in pregnant patients with coccidioidomycosis. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 1201-1203.
3. **Barnato, A. E., G. D. Sanders, und D. K. Owens.** 2001. Cost-effectiveness of a potential vaccine for *Coccidioides immitis*. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 797-806.
4. **Bialek, R., A. Cascante Cirera, T. Herrmann, C. Aepinus, V. I. Shearn-Bochsler, und A. M. Legendre.** 2003. Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 205-208.
5. **Bialek, R., A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nübling, V. J. Robertson, J. Knobloch, und R. Hohle.** 2002 a. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1644-1647.
6. **Bialek, R., M. Weiss, K. Bekure-Nemariam, L. K. Najvar, M. B. Alberdi, J. R. Graybill, und U. Reischl.** 2002 b. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real time PCR assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 463-471.
7. **Bialek, R., J. Fischer, A. Feucht, L. K. Najvar, K. Dietz, J. Knobloch, und J. R. Graybill.** 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1506-1509.
8. **Bialek, R., A. Ibricevic, C. Aepinus L. K. Najvar, A. W. Fothergill, J. Knobloch, und J. R. Graybill.** 2000. Detection of *Paraccocidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2940-2942.
9. Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung – BioStoffV). 1999.
10. **Blair J. E., und J. L. Logan.** 2001. Coccidioidomycosis in solid organ transplantation. *Cin. Infect. Dis.* **33**: 1536-1544.

11. **Burt, A., D. A. Carter, G. L. Koenig, T. J. White, und J. W. Taylor.** 1995. A safe method of extracting DNA from *Coccidioides immitis*. Fungal Genetics Newsletter **42**: 23.
12. **Cairns, L., D. Blythe, A. Kao, D. Pappagianis, L. Kaufmann, J. Kobayashi, und R. Hajjeh.** 2000. Outbreak of coccidioidomycosis in Washington State residents returning from Mexico. Clin. Infect. Dis. **30**: 61-64.
13. **CDC.** 1993. Coccidioidomycosis - United States, 1991-1992. MMWR **42**: 21-24.
14. **CDC.** 1994. Update: Coccidioidomycosis - California, 1991-1993. MMWR **43**: 421-423.
15. **Chiller, T. M., J. N. Galgiani, und D. A. Stevens.** 2003. Coccidioidomycosis. Infect. Dis. Clin. North Am. **17**: 41-57.
16. **Colonna-Romano, S., A. Porta, A. Franco, G. S. Kobayashi, und B. Maresca.** 1998. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophages infection. Microbial. Pathogenesis **25**: 55-66.
17. **Delgado, N., J. Xue, J.-J. Yu, C.-Y. Hung, und G. T. Cole.** 2003. A recombinant β -1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. Infect. Immun. **71**: 3009-3010.
18. **Deresinski, S. C..** 1980. Coccidioidomycosis of bone and joints. In: Stevens, D. A., ed. Coccidioidomycosis: a text. Current topics in infectious disease. New York: Plenum medical Book.195-211.
19. **Einstein, H. E., C. W. Holeman Jr., L. L. Sandige, und D. H. Holden.** 1961. Coccidioidal meningitis: the use of amphotericin B in treatment. Calif. Med. **94**: 339-343.
20. **Fisher, M. C., G. L. Koenig, T. J. White, und J.W. Taylor.** 2002. Molecular and phenotype descripton of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. Mycologia **94**: 73-84.

21. **Fisher, M. C., G. L. Koenig, T. J. White, G. Sans-Blas, R. Negroni, I. Gutierrez Alvarez, B. Wanke, und J. W. Taylor.** 2001. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World pattern of human migration. Proc. Natl. Acad. Sci. **98**: 4558-4562.
22. **Fisher, M. C., T. J. White, und J. W. Taylor.** 1999. Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Mol. Ecol. **8**: 1075-1092.
23. **Galgiani, J. N., N. M. Ampel, A. Catanzaro, R. H. Johnson, D. A. Stevens, und P. L. Williams.** 2000. Practice guidelines for the treatment of coccidioidomycosis. Clin. Infect. Dis. **30**: 658-661.
24. **Galgiani, J. N.** 1999. Coccidioidomycosis: A regional disease of national importance. Ann. Intern. Med. **130**: 293-300.
25. **Galgiani, J.N.** 1997. Coccidioidomycosis. Curr. Clin. Top. Infect. Dis. **17**: 188-204.
26. **Gromadzki, S. G., und V. Chaturvedi.** 2000. Limitations of the AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test: false-negative results with formaline-killed cultures. J. Clin. Microbiol. **38**: 2427-2428.
27. **Holmes, A. R., R. D. Cannon, M. G. Shepherd, und H. F. Jenkinson.** 1994. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. J Clin. Microbiol. **32**: 228-231.
28. **Jinadu, B. A.** 1995. Valley Fever Task Force report on the control of *Coccidioides immitis*. Bakerfield, CA: Kern Country health Department.
29. **Kappe, R., C. N. Okeke, C. Fauser, M: Maiwald, und H.-G. Sonntag.** 1998. Molecular probes for detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. J. Med. Microbiol. **47**: 811-820.
30. **Kaufman, L., G. Valero, und A. A. Padhye.** 1998. Misleading manifestations of *Coccidioides immitis* in vivo. J. Clin. Microbiol. **36**: 3721-3723.

31. **Kirkland, T. N., F. Finley, K.I. Orsborn, und J. N. Galgiani.** 1998. Evaluation of the proline-rich antigens of *Coccidioides immitis* as a vaccine candidate in mice. *Infect. Immun.* **66**: 3519-3522.
32. **Kirkland, T. N., und J. Fierer.** 1996. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 192-199.
33. **Koufopanou, V., A. Burt, und J.W. Taylor.** 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 5478-5482.
34. **Lamarre, C., N. Deslauriers, und Y. Bourbonnais.** 2000. Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol. Microbiol.* **35**: 444-453.
35. **Löffler, J.** 1997. Etablierung und Evaluierung molekularbiologischer Methoden humanpathogener Pilze und Charakterisierung azolresistenter Pilzstämme isoliert aus immunsupprimierten Patienten. Biologische Dissertation, Universität Tübingen.
36. **Makimura, K., S. Y. Marayama, und H. Yamaguchi.** 1994. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction. *J. Med. Mycol.* **40**: 358-364.
37. **Nachamkin, I., N. J. Panero, M. Li, H. Ung, P. K. Yuen, L. J. Kricka, und P. Wilding.** 2001. Agilent 2100 Bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 754-757.
38. **Nagai, H., Y. Yamakami, A. Hashimoto, i. Tokimatsu, und M. Nasu.** 1999. PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated trichosporonosis. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 694-699.
39. **Pappagianis, D.** 1993. Evaluation of the protective efficacy of the killed *Coccidioides immitis* spherule vaccine in humans. The Valley Fever Vaccine Study Group. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**: 560-565.
40. **Pappagianis, D..** 1988. Epidemiology of coccidioidomycosis. *Curr Top. Med. Mycol.* **2**: 199-238.

41. **Pappagianis, D., und H. Einstein.** 1978. Tempest from Tehachapi takes toll or *Coccidioides* conveyed aloft and afar. West. J. Med. **129**: 527-530.
42. **Peng, T., K. I. Orsborn, M. J. Orbach , und J. N. Galgiani.** 1999. Proline-rich vaccine candidate antigene of *Coccidioides immitis*: conserving among isolates and differential expression with spherule maturation. J. Infect. Dis. **179**: 518-521.
43. **Reddy, L.V., A. Kumar, und V. P. Kurup.** 1993. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. **7**: 121-126.
44. **Sanger , F., S. Nicklen, und A. R, Coulson.** 1977. DNA squencing with chai-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad- Sci. **74**: 5463-5467.
45. **Schneider, E., R. A. Hajjeh, und R. A. Spiegel.** 1997. A coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, earthquake. JAMA. **277**: 904-908.
46. **Singh, V. R., D. K. Smith, J. Lawrence, P. C. Kelly, A. R. Thomas, B. Spitz, und G. A. Sarosi.** 1996. Coccidioidomycosis in patients infected with Human Immunodeficiency Virus: review of 91 cases at a single institution. Clin. Infect. Dis. **23**: 563-568.
47. **Smith, C. E., R. R. Beard, E. G. Whiting, und H. G. Rosenberg.** 1946. Varieties of coccidioidal infection in relation to the epidemiology and control of diseases. Am. J. Public Health **36**: 1394-1402.
48. **Standeart, S. M., W. Schaffner, und J. N. Galgiani.** 1995. Coccidioidomycosis among visitors to a *Coccidioides immitis*-endemic area; an outbreak in a military reserve unit. J. Infect. Dis. **171**: 1672-1675.
49. **Stevens, D. A..** 1995. Coccidioidomycosis. N. Engl. J. Med. **332**: 1077-1082.
50. **Stockman, L., K. A. Clark, J. M. Hunt, und G. D. Roberts.** 1993. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Histoplasma capsulatum*. J. Clin. Microbiol. **31**: 845-850.

51. **Valesco, M., und K. Johnston.** 1997. Stability of hybridization activity of *Coccidioides immitis* in live and heat-killed frozen cultures tested by AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test. J. Clin. Microbiol. **35**: 736-737.
52. **Wages, D. S., L. Helfend, und H. Finkle.** 1995. *Coccidioides immitis* presenting as a hyphal form in a ventriculoperitoneal shunt. Arch. Pathol. Lab. Med. **119**: 91-93.
53. **Wahyuningsih, R., H.-J. Freisleben, H.-G. Sonntag, und P. Schnitzler.** 2000. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive Candidiasis. J. Clin. Microbiol. **38**: 3016-3021.
53. **Wernicke, R.** 1892. Ueber einen Protozoenbefund bei Mycosis fungoides (?). Centralbl. Bacteriol. Parasitenkd. **12**: 859-861.
54. **Wieden, M. A., L. L. Lundergan, J. Blum, K. L. Delgado, R. Coolbaugh, und R. Howard.** 1996. Detection of coccidioidal antibodies by 33 – kDa spherule antigen, Coccidioides EIA and standard serologic tests in sera from patients evaluated for coccidioidomycosis. J. Infect. Dis. **173**: 1273-1277.
55. **Yamakami, Y., A. Hashimoto, E. Yamagata, P. Kamberi, R. Karashima, H. Nagai, und M. Nasu.** 1998. Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. J. Clin. Microbiol. **36**: 3619-3623.
56. **Yamakami, Y., A. Hashimoto, I. Tokimatsu, und M. Nasu.** 1996. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. **34**: 2464-2468.
57. **Yang, C., Y. Zhu, D. M. Magee, und R. A. Cox.** 1996. Molecular cloning and characterization of the *Coccidioides immitis* complement fixation/chitinase antigen. Infect. Immun. **64**: 1992-1997.

Eigene Veröffentlichungen:

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit präsentierten Daten wurden vom Journal of Clinical Microbiology angenommen und unter dem Titel: „PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen“ im Februar 2004 veröffentlicht:

Bialek, R., J. Kern, T. Herrmann, R. Tijerina, L. Ceceñas, U. Reischl und G. M. González. 2004. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. J. Clin. Microbiol. **42**: 778-783.

Legende

A	Adenin
Abb.	Abbildung
b.i.d.	bis in die; zweimal täglich
BLAST	Suchprogramm der NCBI-Gendatenbank
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca,	circa
C	Cytosin
cm	Zentimeter
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
Ø	Durchmesser
et al.	und andere
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, Enzymimmuntest
Fg	Femtogramm
g	Gramm
G	Guanin
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iv.	intravenös
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
Min.	Minute
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mg	Milligramm

Legende

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
N ^o	Nummer
nm	Nanometer
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Washington DC, USA
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
po.	per os
%	Prozent
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
Sek.	Sekunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _m	Schmelzpunkt
U	Unit
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Jürgen Knobloch für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, Erfahrungen auf dem Gebiet der Tropenmedizin und der mikrobiellen Diagnostik sammeln zu können.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Ralf Bialek für die ausgezeichnete Betreuung der Doktorarbeit und die überaus angenehme Zusammenarbeit danken. Darüber hinaus möchte ich mich für die Durchführung der Versuchsteile in Mexiko, die fachkundigen Ratschläge und die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Danken möchte ich Frau Dr. Gloria Gonzales, ohne deren mykologische Erfahrung und Einsatz die Durchführung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Udo Reischl und Frau Maria Bibianna Alberdi für die Betreuung meiner ersten Schritte mit dem LightCycler und die Durchführung der Experimente auf demselben.

Bei Herrn Walter Deschle möchte ich mich für die Einführung in die Kunst der PCR-Diagnostik und die praxisnahen Ratschläge herzlich bedanken.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Jan Kern
Geburtsdatum: 16. August 1977
Geburtsort: Tübingen

Schulzeit und Studium:

1984 – 1988 Besuch der Grundschule an der Dorfackerschule Lustnau
1988 – 1997 Gymnasialzeit und Abitur am Kepler-Gymnasium Tübingen
1997 - 1998 Zivildienst an der BG Unfallklinik Tübingen
Seit WS 1998 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 2000 Ärztliche Vorprüfung
August 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
31. Mai 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

- Allgemeine Pädiatrie im St. Josephs Krankenhaus in Berlin Tempelhof
- Innere Medizin im Krankenhaus Friedrichshain in Berlin
- Tätigkeit als studentischer Tutor in der Kinderklinik der Universität Tübingen
- Neurologie im Krankenhaus am Urban in Berlin Kreuzberg